

**Expression und Regulation von BMPs im
hepatozellulären Karzinom HCC – Wechselwirkung
mit Proteinase-aktivierten Rezeptoren**

Dissertation

**zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae
(Dr. med.)**

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

**von Tina Baumann
geboren am 29.09.1983 in Meiningen**

Gutachter

1. Prof. Dr. med. Klaus Höffken, Jena
2. Prof. Dr. med. Utz Settmacher, Jena
3. PD Dr. med. Merten Hommann, Bad Berka

Tag der öffentlichen Verteidigung: 04.01.2011

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AktR	Aktivinrezeptor
ALK	Activin-like Kinase
BAMBI	BMP and Activin Membrane Bound Inhibitor
BMP	Bone Morphogenetic Protein (Knochenmorphogenesefaktor)
BMP-R	BMP-Rezeptor
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	complementary DNA
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanidintriphosphat
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium (Zellkulturmedium)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
D-PBS	Dulbecco`s Phosphate Buffered Saline
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
ECL	Enhanced Chemoluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
EMT	Epithelial-Mesenchymale-Transition
ERK	Extracellular Signal-Regulated Kinase
FCS	Fötales Kälberserum
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis-C-Virus
Hep3B	Zelllinie des hepatozellulären Karzinoms

HepG2	Zelllinie des hepatozellulären Karzinoms
HGF	Hepatocyte Growth Factor
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
M-MLV	Moloney Murine Leukemia Virus
mRNA	messenger RNA
NIH-U	Einheit der Thrombinaktivität (NIH-National Institute of Health)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAR	Proteinase-aktivierter Rezeptor
PAR-AP	PAR-aktivierendes Peptid
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PLC	Proteinlipase C
PVDV	Polyvinylidenfluorid
rh	rekombinant human
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Zellkulturmedium)
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinase
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sf	serumfrei
Sk-Hep1	Zelllinie des hepatozellulären Karzinoms
Smad	Mother against decapentaplegic
Smurf	Smad ubiquitination regulatory factor
Tab.	Tabelle
TAE	Puffer mit Tris-HCl, Eisessig und EDTA
Taq-Polymerase	DNA-Polymerase aus <i>thermus aquaticus</i>
TBS-T	Tris-Buffered Saline Tween-20
TGF- α	Transforming Growth Factor Alpha
TGF- β	Transforming Growth Factor Beta
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Relevante Signalwege in der Entwicklung und Progression des hepatozellulären Karzinoms	6
Abb. 2	Darstellung der Beziehungen zwischen Liganden, Rezeptoren, Corezeptoren und Smads im TGF- β -System und im BMP-System	9
Abb. 3	BMP-Signalweg	10
Abb. 4	Schematische Darstellung der Aktivierung von PAR ₁	16
Abb. 5	Western Blot Sandwich	40
Abb. 6	Durch realtime-PCR ermitteltes Expressionsmuster der Mitglieder des BMP-Signalwegs in drei etablierten humanen HCC-Zelllinien	46
Abb. 7	Expressionslevel von BMP-2, BMP-5, BMP-6 und BMP-7 bei der Zelllinie Hep3B im Inkubationsversuch mit PAR-Agonisten PAR ₁ , PAR ₂ und PAR ₄	50
Abb. 8	Expressionslevel der BMP-Rezeptoren BMPR-IA, BMPR-IB und BMPR-II bei der Zelllinie Hep3B im Inkubationsversuch mit PAR-Agonisten PAR ₁ , PAR ₂ und PAR ₄	51
Abb. 9	Expressionslevel der Aktivinrezeptoren AktR-IA, AktR-IB, AktR-IIA und AktR-IIB bei der Zelllinie Hep3B im Inkubationsversuch mit PAR-Agonisten PAR ₁ , PAR ₂ und PAR ₄	53
Abb. 10	Expressionslevel der BMP-Inhibitoren Gremlin, Noggin, Dan und Chordin bei der Zelllinie Hep3B im Inkubationsversuch mit PAR-Agonisten PAR ₁ , PAR ₂ und PAR ₄	54
Abb. 11	Expressionslevel der BMP-Zielgene ID-1 und ID-2 bei der Zelllinie Hep3B im Inkubationsversuch mit PAR-Agonisten PAR ₁ , PAR ₂ und PAR ₄	55
Abb. 12	Expressionslevel der BMP-Zielgene ID-1 und ID-2 bei der Zelllinie Hep3B im Inkubationsversuch mit rh-BMP-2	57
Abb. 13	Expressionslevel der Thrombin-Zielgene VEGF und Met bei der Zelllinie Hep3B im Inkubationsversuch mit rh-BMP-2	58
Abb. 14	Expressionslevel der BMP-Zielgene ID-1 und ID-2 bei der Zelllinie HepG2 im Inkubationsversuch mit rh-BMP-2	59
Abb. 15	Expressionslevel der Thrombin-Zielgene VEGF und Met bei der Zelllinie HepG2 im Inkubationsversuch mit rh-BMP-2	60
Abb. 16	Expressionslevel der BMP-Zielgene ID-1 und ID-2 bei der Zelllinie Sk-Hep1 im Inkubationsversuch mit rh-BMP-2	61
Abb. 17	Expressionslevel der Thrombin-Zielgene VEGF und Met bei der Zelllinie Sk-Hep1 im Inkubationsversuch mit rh-BMP-2	62
Abb. 18	Expressionslevel der Thrombin-Zielgene VEGF und Met bei der Zelllinie Hep3B im Inkubationsversuch mit Thrombin	63
Abb. 19	Expressionslevel der BMP-Zielgene ID-1 und ID-2 bei der Zelllinie Hep3B im Inkubationsversuch mit Thrombin	64

Abb. 20	Expressionslevel der Thrombin-Zielgene VEGF und Met bei der Zelllinie HepG2 im Inkubationsversuch mit Thrombin	65
Abb. 21	Expressionslevel der BMP-Zielgene ID-1 und ID-2 bei der Zelllinie HepG2 im Inkubationsversuch mit Thrombin	66
Abb. 22	Expressionslevel der Thrombin-Zielgene VEGF und Met bei der Zelllinie Sk-Hep1 im Inkubationsversuch mit Thrombin	67
Abb. 23	Expressionslevel der BMP-Zielgene ID-1 und ID-2 bei der Zelllinie Sk-Hep1 im Inkubationsversuch mit Thrombin	68
Abb. 24	Steigerung der Migration von Hep3B-Zellen durch Thrombin und durch PAR-Agonisten	69
Abb. 25	Steigerung der Migration von Hep3B-Zellen durch rhBMP-2	70
Abb. 26	Keine Verstärkung der durch Thrombin und durch den PAR ₁ -Agonisten gesteigerten Migration von Hep3B-Zellen in Kombination mit rhBMP-2	72
Abb. 27	Beeinflussung der durch Thrombin stimulierten Migration von Hep3B-Zellen durch rhNoggin und rhALK3	73
Abb. 28	Hemmung der durch die PAR-Agonisten stimulierten Migration von Hep3B-Zellen durch rhNoggin	74
Abb. 29	Hemmung der durch Thrombin stimulierten Migration von Hep3B-Zellen durch Dorsomorphin	76
Abb. 30	Hemmung der durch den PAR ₁ -Agonisten stimulierten Migration von Hep3B-Zellen durch Dorsomorphin	77
Abb. 31	Phosphorylierungsstatus von Smad1/5/8 nach Inkubation von Hep3B-Zellen	79
Abb. 32	Phosphorylierungsstatus der p44/42 MAPK nach Inkubation von Hep3B-Zellen	80
Abb. 33	Phosphorylierungsstatus der p38 MAPK nach Inkubation von Hep3B-Zellen	81
Abb. 34	Phosphorylierungsstatus von Akt nach Inkubation von Hep3B-Zellen	82
Abb. 35	Phosphorylierungsstatus von Met nach Inkubation von Hep3B-Zellen	83

Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Verwendete humane Zelllinien und deren Eigenschaften	21
Tab. 2	Verwendete Kulturmedien und Lösungen und deren Zusammensetzung	21
Tab. 3	Verwendete Puffer und Lösungen und deren Zusammensetzung	21
Tab. 4	Eingesetzte Peptide	24
Tab. 5	Eingesetzte primäre Antikörper	24
Tab. 6	Eingesetzte sekundäre Antikörper	25
Tab. 7	Für die Inkubation eingesetzte Substanzen und deren Konzentrationen	29
Tab. 8	PCR-Programme	32
Tab. 9	Standardprogramm am LightCycler®	35
Tab. 10	Programme am Mastercycler® ep realplex	35
Tab. 11	Eingesetzte primäre und sekundäre Antikörper	41
Tab. 12	Relative mRNA-Expression von Mitgliedern des BMP-Netzwerkes in drei humanen HCC-Zelllinien	44

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	III
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	V
TABELLENVERZEICHNIS	VII
ZUSAMMENFASSUNG	1
1 EINLEITUNG	3
1.1 Karzinogenese	3
1.2 Hepatozelluläres Karzinom	3
1.2.1 Epidemiologie	3
1.2.2 Ätiologie	4
1.2.3 Pathogenese	4
1.2.4 Genetische und molekulare Alterationen im HCC	5
1.2.5 Problematik und Therapieansätze	6
1.3 TGF-β-Superfamilie	7
1.4 Bone Morphogenetic Proteins (BMPs)	7
1.4.1 Signaltransduktion	8
1.4.2 Modulation der Signaltransduktion	11
1.4.3 BMPs im Tumorgeschehen	12
1.5 Proteinase-aktivierte Rezeptoren (PARs)	13
1.5.1 PAR ₁	14
1.5.2 PAR ₂	14
1.5.3 PAR ₃	15
1.5.4 PAR ₄	15
1.5.5 Mechanismen der Rezeptoraktivierung	15
1.5.6 Signalweiterleitung über G-Proteine	16
1.5.7 PARs im Tumorgeschehen	17
1.6 Met-Rezeptor	18
1.6.1 Struktur des Met –Rezeptors	19
1.6.2 Signalweiterleitung	19
1.6.3 Met im Tumorgeschehen	19
1.7 Zielstellung	20
	VIII

2	MATERIALIEN	21
2.1	Zelllinien	21
2.2	Kulturmedien und Lösungen für die Zellkultur	21
2.3	Zusammensetzung von Puffern und Lösungen	21
2.4	Verwendete Kits	23
2.5	Primer für die RT-PCR und realtime-PCR	23
2.6	Eingesetzte Peptide	24
2.7	Antikörper	24
2.7.1	Primäre Antikörper	24
2.7.2	Sekundäre Antikörper	25
2.8	PC-Programme	25
3	METHODEN	26
3.1	Zellkultur	26
3.1.1	Zelllinien	26
3.1.1.1	Sk-Hep1	26
3.1.1.2	HepG2	26
3.1.1.3	Hep3B	26
3.1.2	Kryokonservierung von Zellen	27
3.1.3	Auftauen kryokonservierter Zellen	27
3.1.4	Passagieren der Zellen	27
3.1.5	Zellzahlbestimmung	28
3.2	Inkubationsversuche	28
3.2.1	Tag 1 – Aussäen der Zellen	28
3.2.2	Tag 2 – Zellen serumfrei machen	28
3.2.3	Tag 3 und 4 – Inkubation der Zellen	29
3.3	Isolierung der Gesamt-RNA	29
3.4	RNA-Konzentrationsbestimmung	30
3.5	cDNA-Synthese	31
3.6	RT-PCR	32
3.7	Auftrennung der PCR-Produkte durch Agarosegelelektrophorese	33
3.8	Realtime-PCR	34
3.9	Migrationsversuche	36
3.9.1	Vorbereitung	36
3.9.2	Ansatz des Migrationsversuches	36
3.9.3	Färbung der Polycarbonatmembran und Auswertung	37

3.10	Western Blot	38
3.10.1	Poteinisolierung	38
3.10.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	38
3.10.3	Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE	39
3.10.4	Das Blotten	40
3.10.5	Inkubation mit Antikörpern und Detektion der Proteine	40
3.10.6	Rehybridisierung der Membran	41
3.10.7	Auswertung	42
3.11	Statistische Auswertung	42
4	ERGEBNISSE	43
4.1	Bestimmung des Expressionsmusters von Mitgliedern des BMP-Netzwerkes in etablierten Zelllinien des HCCs	43
4.1.1	Untersuchung mittels RT-PCR und Agarosegelelektrophorese	43
4.1.2	Untersuchung mittels realtime-PCR	45
4.2	Untersuchung der Interaktionen des BMP-Systems und des Thrombin-/PAR-Systems auf Transkriptionsebene mittels Inkubationsversuchen und realtime-PCR	47
4.2.1	Einfluss von PAR-Agonisten auf die Expression von Mitgliedern und von Zielgenen des BMP-Systems	48
4.2.1.1	Zelllinie Hep3B	48
4.2.1.2	Zelllinien HepG2 und Sk-Hep1	55
4.2.2	Einfluss von rhBMP-2 auf Zielgene des BMP-Systems und des Thrombin-Systems	56
4.2.2.1	Zelllinie Hep3B	57
4.2.2.2	Zelllinie HepG2	58
4.2.2.3	Zelllinie Sk-Hep1	60
4.2.3	Einfluss von Thrombin auf Zielgene des Thrombin-Systems und des BMP-Systems	62
4.2.3.1	Zelllinie Hep3B	63
4.2.3.2	Zelllinie HepG2	64
4.2.3.3	Zelllinie Sk-Hep1	66
4.3	Untersuchung der Interaktionen des BMP-Systems und des Thrombin-/PAR-Systems auf Aktivitätsebene mittels Migrationsversuchen	68
4.3.1	Einfluss von Thrombin und von PAR-Agonisten auf die Migration von Hep3B-Zellen	69
4.3.2	Einfluss von rhBMP-2 auf die Migration von Hep3B-Zellen	70
4.3.3	Einfluss von Thrombin und des PAR ₁ -Agonisten in Kombination mit rhBMP-2 auf die Migration von Hep3B-Zellen	71
		X

4.3.4	Einfluss von rhNoggin und rhALK3 auf die durch Thrombin stimulierte Migration von Hep3B-Zellen	72
4.3.5	Einfluss von rhNoggin auf die durch die PAR-Agonisten stimulierte Migration von Hep3B-Zellen	74
4.3.6	Einfluss von Thrombin in Kombination mit Dorsomorphin auf die Migration von Hep3B-Zellen	75
4.3.7	Einfluss des PAR ₁ -Agonisten in Kombination mit Dorsomorphin auf die Migration von Hep3B-Zellen	76
4.3.8	Ausschluss von Proliferation mittels Mitomycin-Test	77
4.4	Untersuchung der Interaktionen des BMP-Systems und des Thrombin-/PAR-Systems auf Proteinebene mittels Western Blot	77
4.4.1	Phosphorylierungsstatus von Smad1/5/8 nach Inkubation von Hep3B-Zellen mit Dorsomorphin	78
4.4.2	Phosphorylierungsstatus der p44/42 MAP-Kinase nach Inkubation von Hep3B-Zellen mit Dorsomorphin	79
4.4.3	Phosphorylierungsstatus der p38 MAP-Kinase nach Inkubation von Hep3B-Zellen mit Dorsomorphin	80
4.4.4	Phosphorylierungsstatus von Akt nach Inkubation von Hep3B-Zellen mit Dorsomorphin	81
4.4.5	Phosphorylierungsstatus von Met nach Inkubation von Hep3B-Zellen mit Dorsomorphin	82
5	DISKUSSION	84
	LITERATURVERZEICHNIS	i
	ANHANG	xviii

Zusammenfassung

Da die therapeutischen Optionen für das hepatozelluläre Karzinom (HCC) unzureichend sind, ist die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien im Sinne einer zielgerichteten Therapie dringend erforderlich. Für einen derartigen Ansatz wird die Identifizierung vielfältig veränderter, molekularer Mechanismen sowie in die Hepatokarzinogenese involvierter Signalwege und deren Interaktionen als eine entscheidende Voraussetzung für die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze für das HCC eingeschätzt. Die Funktion von Bone Morphogenetic Proteins (BMPs), TGF- β -verwandten Wachstumsfaktoren, sowie von Proteinase-aktivierten Rezeptoren (PARs) konnte in der Karzinogenese und im Metastasierungsgeschehen verschiedener Tumoren nachgewiesen werden. Zur Expression und tumorbiologischen Relevanz der BMPs im HCC liegen nur wenige Befunde vor. Für die PARs, von denen in Untersuchungen der Arbeitsgruppe Kaufmann eine Funktion bei der Migration und Invasion dieser Zellen gezeigt werden konnte, lässt sich auf eine Beteiligung am HCC-Metastasierungsgeschehen schließen.

Vor diesem Hintergrund wurde im Rahmen der vorliegenden Dissertationsarbeit untersucht, ob ebenso Mitglieder des BMP-Signalwegs im HCC nachweisbar sind und ob Interaktionen zwischen diesem und dem Signalweg der Proteinase-aktivierten Rezeptoren bestehen.

Hierfür wurde zunächst die Genexpression von BMPs, von BMP-Rezeptoren (BMPR), von Aktivinrezeptoren (AktR) und von BMP-Inhibitoren bei den etablierten HCC-Zelllinien Hep3B, HepG2 und Sk-Hep1 sowohl mittels qualitativer RT-PCR als auch mittels quantitativer realtime-PCR analysiert. Dabei konnten alle für ein aktives BMP-Signaling notwendigen Komponenten, einschließlich inhibitorische BMPs und negativ regulatorische BMP-Inhibitoren, nachgewiesen werden. Dies lässt eine Beteiligung von Mitgliedern des BMP-Netzwerkes an der Entstehung und Progression des hepatozellulären Karzinoms vermuten. Mögliche Regulationen zwischen Mitgliedern beider Signalsysteme wurden mittels Inkubationsversuchen und realtime-PCR auf Transkriptionsebene untersucht. Dafür wurden die Zellen für 4h und 24h mit Effektoren inkubiert. Die Expression von Mitgliedern des BMP-Systems und von Zielgenen beider Signalwege wurde mittels realtime-PCR quantifiziert. Dabei konnten Interaktionen des BMP-Systems und des Thrombin-/PAR-Systems auf Transkriptionsebene jedoch nicht nachgewiesen werden.

Für eine weitere Analyse der Interaktionen des BMP-Systems und des Thrombin-/PAR-Systems wurde die Migration, ein komplexer und tumorbiologisch bedeutsamer Prozess, anhand eines in-vitro Modells untersucht. Dabei wurde der Einfluss von Thrombin, von PAR-

Subtyp-selektiven Agonisten, rhBMP-2, BMP-Inhibitoren, BMP-Rezeptor-Inhibitoren oder deren Kombination auf die Migration von Hep3B-Zellen in einem Transwell-Kammer-System nach 24h analysiert. Es zeigte sich, dass Thrombin (1,0 NIH-U/ml), ein selektiver PAR₁-Agonist (100 µM) und ein selektiver PAR₄-Agonist (400 µM) eine signifikante Steigerung der Migrationsrate im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle induzieren. Ebenso bewirkt rhBMP-2 eine konzentrationsabhängige, signifikante Steigerung der Migration von Hep3B-Zellen durch eine Polycarbonatmembran nach 24h. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird somit demonstriert, dass der Einsatz extrazellulärer Effektoren einen Einfluss auf die Zellmigration, einen komplexen, zellphysiologischen und tumorbiologisch bedeutsamen Vorgang, bei Hep3B-Zellen hat. Der kombinierte Einsatz von rhNoggin, einem extrazellulären BMP-Inhibitor, und Thrombin bzw. des PAR₁/PAR₄-Agonisten führt zu einer signifikanten Abnahme der vorher stimulierten Zellmigration von Hep3B-Zellen nach 24h. Ebenso kann die Zellmigration durch den Einsatz von Dorsomorphin gehemmt werden. Dabei deutet die Hemmung der Thrombin- und PAR-stimulierten Zellmigration von Hep3B Zellen durch den kombinierten Einsatz mit rhNoggin, einem extrazellulären BMP-Inhibitor, und Dorsomorphin, einer auf Rezeptorebene wirkenden Substanz, auf komplexe molekulare Interaktionen beider Signalkaskaden hin.

Auf Grundlage dessen wurde überprüft, ob Dorsomorphin ebenso zu einer geänderten Aktivierung von Signalwegen führt. Für die Identifizierung veränderter, intrazellulärer Signalmoleküle, die an der Vermittlung der beobachteten Effekte möglicherweise beteiligt sind, wurden Untersuchungen auf Proteinebene durchgeführt. Dafür wurden Hep3B-Zellen für 24h mit unterschiedlichen Konzentrationen an Dorsomorphin (2, 5, 10 µM) und mit rhBMP-2 (100 ng/ml) als Positivkontrolle inkubiert. Bei der p44/42 MAP-Kinase, die ein „downstream“-Molekül der Thrombin-/PAR-Signalkaskade darstellt, führt Dorsomorphin zu einer konzentrationsabhängigen Steigerung der Phosphorylierung. Der Phosphorylierungsstatus von Akt, einem „downstream“-Molekül beider Signalwege, und der p38 MAP-Kinase bleibt hingegen unbeeinflusst. Phänomene der Interferenz spiegeln sich ebenso nach Einfluss von Dorsomorphin im Phosphorylierungsstatus von Met wieder. Somit könnten sowohl Met als auch die p44/42 MAP-Kinase mögliche „crossing-points“ beider Signalsysteme darstellen, jedoch sind weitere Untersuchungen essentiell, um diese Aussage zu stärken. Sowohl Rho als auch die PI3K, Vermittler intrazellulärer Interaktionen, bilden mögliche Ansatzpunkte für weitere experimentelle Untersuchungen. Zusammenfassend bestärken die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse die Hypothese von Interaktionen beider Signalsysteme.

1 Einleitung

1.1 Karzinogenese

Die Karzinogenese ist ein äußerst komplexes und multifaktorielles Geschehen (Weinberg 1989, Sugimura 1992), bei dem die Akkumulation von chromosomalen, genetischen und epigenetischen Veränderungen zu zellulären Dysfunktionen führen kann (Wong und Ng 2008). Eine wesentliche Rolle spielen unter anderem sequenzielle Alterationen von Onkogenen oder Tumorsuppressorgenen in den Tumorzellen. Der Verlust der Heterozygotie (LOH, loss of heterozygosity) multipler Chromosomen unterstützt den Ansatz einer „multistep“-Karzinogenese (Boige et al. 1997, Marchio et al. 1997). Die Tumorentstehung kann hierbei durch die Aktivierung oder Überexpression von Onkogenen, verursacht durch chromosomale Rearrangements, Mutationen und Genamplifikationen, als auch durch Inaktivierung oder Verlust von Tumorsuppressorgenen initiiert werden (Okuda 2000, Croce 2008). Während der Tumorprogression wird eine Herunterregulation epithelialer Marker und der Verlust von Zell-Zell-Kontakten beobachtet. Der Verlust epithelialer Eigenschaften resultiert in einer gesteigerten Zellmotilität und einer erhöhten Expression mesenchymaler Gene. Dieser Prozess, der als Epithelial-Mesenchymale-Transition (EMT) bezeichnet wird, führt im Krebsgeschehen zu einer vermehrten Ausbildung maligner Zelleigenschaften, einschließlich verminderter Wachstumskontrolle und erhöhter Invasivität (Thiery 2003). Die EMT korreliert hierbei mit einer schlechten histologischen Differenzierung, einer Destruktion der Gewebeintegrität und der Metastasierung (Christiansen und Rajasekaran 2006). Die Metastasierung ist ein mehrschrittiger Prozess. Dieser ist durch die Dissoziation der Tumorzellen von der epithelialen Oberfläche, durch die Penetration durch die Basalmembran, durch die Intravasation in das Gefäßsystem mit dem Überleben im Blutstrom, durch die Extravasation an entfernter Stelle und durch das Wachstum von Metastasen mit Stimulation der Neoangiogenese charakterisiert (Chambers et al. 2002).

1.2 Hepatozelluläres Karzinom

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist mit 85% der häufigste primäre maligne Tumor der Leber (Kew 2002).

1.2.1 Epidemiologie

Das HCC gehört heute zu den fünf häufigsten Malignomen weltweit und steht an dritter Stelle der Krebs-assoziierten Todesursachen (Parkin et al. 2001, El-Serag 2002). Mit einer

altersabhängigen Neuerkrankungsrate von 5,5-14,9 pro 100.000 Einwohner werden jährlich 500.000 neue Fälle diagnostiziert (Llovet et al. 2003). Die Inzidenz dieser Krebserkrankung ist vor allem in Europa (Deuffic et al. 1998) und den USA (El-Serag und Mason 1999) steigend. Dies wird auf die zunehmende Zahl der Infektionen mit dem Hepatitis-B-Virus (HBV) und dem Hepatitis-C-Virus (HCV) als auch auf den chronischen Alkoholmissbrauch in den westlichen Länder zurückgeführt (McKillop et al. 2006).

1.2.2 Ätiologie

Das hepatozelluläre Karzinom gehört zu den wenigen Tumorerkrankungen, bei denen die Risikofaktoren genau definiert sind (El-Serag et al. 2003). In 80% der Fälle entwickelt sich das HCC auf der Grundlage einer zirrhotischen Leber, so dass die Leberzirrhose den stärksten prädisponierenden Faktor darstellt (Bosch et al. 1999, Llovet et al. 2003). In den westlichen Ländern wird die Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms in einer zirrhotischen Leber zu 80% durch eine chronische Hepatitis-C-Infektion, eine chronische Hepatitis-B-Infektion, durch Alkoholmissbrauch oder durch Hämochromatose verursacht (Höpfner et al. 2008). Bei der HCV-assoziierten Leberzirrhose handelt es sich, mit einem 17-fach erhöhten Erkrankungsrisiko (Gordon et al. 1998, Degos et al. 2000), um den wichtigsten Risikofaktor (Bosch et al. 2005, McKillop et al. 2006). Weitere Risikofaktoren sind Aflatoxine in der Nahrung, Steatohepatitis, Typ-2-Diabetes, verbunden mit einer Hyperinsulinämie und einer erhöhten IGF-1-Produktion, Morbus Wilson, die primär biliäre Zirrhose sowie angeborene Stoffwechselerkrankungen der Leber (Smela et al. 2001, Smedile und Bugianesi 2005, Davila et al. 2005, McKillop et al. 2006).

1.2.3 Pathogenese

Die Pathophysiologie des hepatozellulären Karzinoms ist nicht vollkommen geklärt, jedoch wird die zugrunde liegende Leberdysfunktion, insbesondere die Leberzirrhose, als ein prädisponierender Zustand angenommen (Aravalli et al. 2008). Die Pathogenese des hepatozellulären Karzinoms folgt, unabhängig von der Ätiologie, einem gemeinsamen Schema. Vor dem Hintergrund inflammatorischer Prozesse entwickelt sich zunächst eine Hepatitis, gefolgt von einer Fibrosierung bis zur Zirrhose der Leber. Aus einem hepatozellulären Adenom, einer präneoplastischen Läsion, entwickelt sich schließlich das HCC (McKillop et al. 2006). Arakawa et al. dokumentierten erstmals 1986, dass frühe HCCs aus adenomatösen, hyperplastischen Knoten entstehen (Arakawa et al. 1986), die als Vorläufer der malignen Transformation gelten (Takayama et al. 1990). Die frühen histologischen Veränderungen sind durch einen erhöhten Zellumsatz, durch irreguläre, dünne

und trabekuläre Strukturen sowie durch die Formation von Pseudodrüsen gekennzeichnet. Dabei ist das beginnende Karzinom gut differenziert (Okuda 2000). Mit dem Wachstum und zunehmender Dedifferenzierung des Tumors kommt es zur Zellinvasion in fibröses Stromagewebe und in Gefäßwände der zirrhotischen Leber (Nakano et al. 1997, Okuda 2000).

1.2.4 Genetische und molekulare Alterationen im HCC

Die schrittweise Akkumulation von genetischen Alterationen wurde als einer der Hauptmechanismen beschrieben, die zur malignen Transformation und somit zur Hepatokarzinogenese führen. Die genetischen und epigenetischen Veränderungen beinhalten die Aktivierung von positiven Mediatoren der Zellproliferation, einschließlich Protoonkogenen und mitogenen Signalwegen, und die Inaktivierung von negativen Mediatoren der Zellproliferation wie Tumorsuppressorgene. Daraus resultiert ein autonomes Wachstumspotential der Zellen (Feitelson et al. 2002, Pang et al. 2006). Diese genetischen und epigenetischen Veränderungen treten während der Initiierung, der Promotion und der Progression der Erkrankung auf (Aravalli et al. 2008).

Dysregulationen von Wachstumsfaktoren, von Rezeptoren und von sich anschließenden Signalkaskaden repräsentieren ein zentrales, protumorigenes Prinzip in der menschlichen Hepatokarzinogenese. Wachstumsfaktoren besitzen multiple, sich teilweise überlappende Funktionen (mitogen, antiapoptotisch und angiogen) und vermitteln ihre Effekte sowohl autokrin als auch parakrin via Membranrezeptoren. Sie spielen nicht nur eine Rolle in der Embryogenese und in der Organentwicklung sondern auch in der Gewebsregeneration und -reparatur. Im Falle des hepatozellulären Karzinoms umfassen derartige Dysregulationen auf Signalweiterleitungsebene vor allem Signalwege des Insulin-like Growth Factors (IGF), des Hepatocyte Growth Factors (HGF/Met), Wingless (Wnt/ β -Catenin/FZD), des Transforming Growth Factors α (TGF- α) und des Transforming Growth Factors β (TGF- β). Diese sind maßgeblich an der Entwicklung proliferativer und invasiver Eigenschaften von HCC-Zellen beteiligt (Breuhahn et al. 2006).

In **Abb. 1** sind die wesentlichen Signalwege schematisch dargestellt. Es wird deutlich, dass insbesondere der Wnt/ β -Catenin-Signalweg und solche Pathways, deren Signale über Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTKs) vermittelt werden, entscheidend für die Ausbildung neoplastischer Eigenschaften eines HCCs sind (Avila et al. 2006).

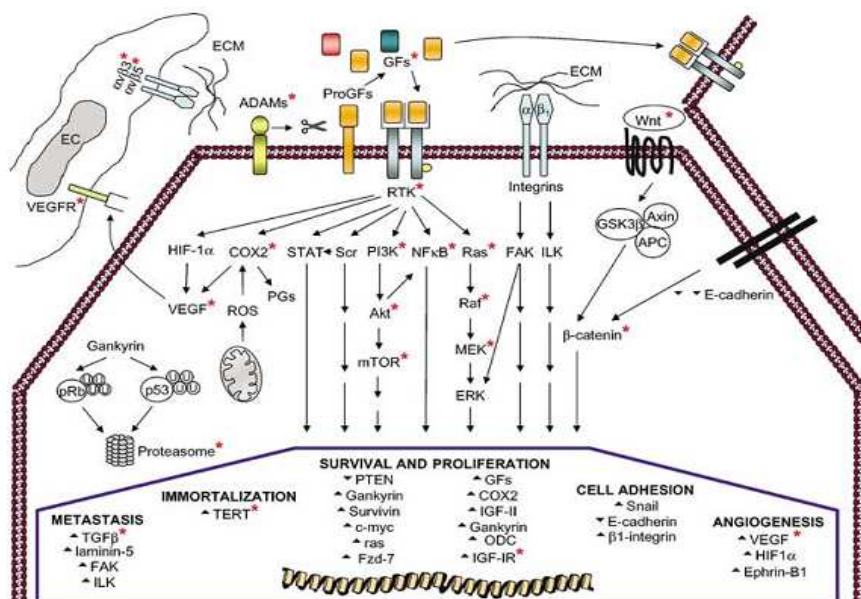


Abb. 1 Relevante Signalwege in der Entwicklung und Progression des hepatozellulären Karzinoms (Avila et al. 2006)

1.2.5 Problematik und Therapieansätze

Das hepatozelluläre Karzinom, ein hochmaligner Tumor mit rascher Progredienz und schlechter Prognose, stellt ein großes therapeutisches Problem dar. Auf Grund fehlender oder geringer Symptomatik wird es häufig erst in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert und ist zum Zeitpunkt der Diagnose oftmals inoperabel (Greten et al. 2009). Eine kurative Behandlung lässt sich jedoch nur bei frühzeitig diagnostizierten und lokalisierten Karzinomen operativ durch Resektion oder durch Lebertransplantation erzielen (Pang et al. 2006). Gegenwärtig gibt es zur Behandlung des HCCs keine effektive systemische Chemotherapie. Der Einsatz von Doxorubicin, Cisplatin, Fluorouracil, Interferon, Epirubicin oder Taxol, alleine oder in Kombination, führte zu keinem Überlebensvorteil (McKillop et al. 2006). Alternative, vor allem palliative Behandlungsstrategien, z.B. die arterielle Chemoembolisation, die perkutane intratumorale Ethanolinjektion oder die Radiofrequenzablation, sind Patienten mit lokalisierten Tumoren vorbehalten (Pang et al. 2006) und besitzen ebenso keinen therapeutischen Benefit (McKillop et al. 2006).

Die therapeutischen Optionen für das hepatozelluläre Karzinom sind dementsprechend unzureichend, so dass die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien im Sinne einer zielgerichteten Therapie dringend erforderlich ist. Für einen derartigen Ansatz ist die Identifizierung vielfältig veränderter, molekularer Mechanismen in der Hepatokarzinogenese eine entscheidende Voraussetzung. So gewinnen gegenwärtig zielgerichtete molekulare Therapien an Bedeutung. Insbesondere wird eine Kombinationstherapie zur Inhibierung

mehrerer Rezeptorsysteme als ein viel versprechendes Konzept mit Vorteilen gegenüber einer Monotherapie eingeschätzt (Höpfner et al. 2008). Dabei unterstützen erste Ergebnisse mit dem Multi-Target-Inhibitor Sorafenib, einem für die Therapie des fortgeschrittenen HCCs kürzlich zugelassenen Medikaments, diese Strategie (Tanaka und Arii 2009). Im Falle von Sorafenib (Bay-43-9006) handelt es sich um einen sogenannten Multi-Kinase-Inhibitor vom Typ der Acyl-Harnstoffderivate, der z.B. neben der Raf-Kinase, einem Schlüsselenzym im MAP-Kinase-Signaling, verschiedene Rezeptor-Tyrosin-Kinasen inhibieren kann (Wilhelm und Chien 2002).

Insgesamt wird die Charakterisierung weiterer möglicher, in die Hepatokarzinogenese involvierter Signalwege und deren Interaktionen als eine entscheidende Voraussetzung für die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze für das HCC eingeschätzt.

1.3 TGF- β -Superfamilie

Die Mitglieder der TGF- β (Transforming Growth Factor Beta) -Superfamilie sind strukturell verwandte, multifunktionale, sezernierte Zytokine, welche eine konservierte Polypeptidstruktur aufweisen (Massague 1998, Dennler et al. 2002). Die Superfamilie umfasst über 30 Wachstumsfaktoren, die entsprechend ihrer Sequenzhomologien (Nohe et al. 2004) in zwei Subgruppen unterteilt werden können. Der ersten Subfamilie werden die Aktivine, Nodal, Lefty, Myostatin und die TGF- β s zugeordnet. Eine weitere Subfamilie stellen die Bone Morphogenetic Proteins (BMPs, Knochenmorphogenesefaktoren), das Anti-Müller'sche Hormon (AMH) und verschiedene Growth and Differentiation Factors (GDFs, Wachstums- und Differenzierungsfaktoren) dar (Massague 2008). Diese Proteine spielen eine bedeutende Rolle bei der Regulation essentieller zellulärer Prozesse, einschließlich Zellproliferation, Differenzierung, Apoptose, Gewebsremodelling, Angiogenese, Immunantwort, Migration verschiedener Zelltypen und Zelladhäsion (ten Dijke et al. 2002, Park 2005).

1.4 Bone Morphogenetic Proteins (BMPs)

Die Bone Morphogenetic Proteins (BMPs, Knochenmorphogenesefaktoren) bilden mit bis heute über 30 identifizierten Mitgliedern die größte Untergruppe der TGF- β -Superfamilie (Ducy und Karsenty 2000). Ihren Namen erhielt diese Gruppe von sezernierten Proteinen auf Grund des von Marshall Urist beschriebenen osteoinduktiven Potentials der in demineralisierten Knochen enthaltenen Komponenten nach Implantation in ektopes Gewebe (Urist 1965). Die Fähigkeit dieser Proteine wurde im Anschluss von Reddi et al. genauer

charakterisiert (Reddi und Huggins 1972, Reddi und Huggins 1975, Reddi 1981). Dabei konnte gezeigt werden, dass dieser Effekt den Prozessen während der Frakturheilung und der embryonalen enchondralen Knochenbildung ähnelt. 1988 gelang Wozney et al. erstmalig die Isolierung von BMPs und die Klonierung ihrer cDNAs, wodurch die Zugehörigkeit der BMPs zur TGF- β -Superfamilie demonstriert wurde (Wozney et al. 1988).

Da die BMPs jedoch nicht nur an der Knochenbildung beteiligt sind, ist der Name irreführend. Vielmehr regulieren sie weitere wichtige biologische Prozesse, einschließlich Zellproliferation, Apoptose und Differenzierung, und sind an der Entwicklung von fast allen Organen und Geweben beteiligt. Somit besitzen sie eine bedeutungsvolle Rolle während der Embryogenese (Hogan 1996).

1.4.1 Signaltransduktion

Die Signale der BMPs als Mitglieder der TGF- β -Superfamilie werden über spezifische hetero-tetramere, membranständige Rezeptorkomplexe vermittelt. Dabei vermitteln die Mitglieder der TGF- β -Superfamilie ihre Signale jeweils über zwei Typ-1 und zwei Typ-2 Serin-/Threonin-Kinase-Rezeptoren, deren Interaktionen für die Initiierung der Signaltransduktion essentiell sind. Beide Rezeptortypen sind sich strukturell ähnlich und bestehen aus einer extrazellulären Domäne mit 10-12 Cysteinresten, einer transmembranösen Domäne und einer intrazellulären Domäne, die eine Serin-/Threonin-Kinase-Aktivität besitzt (Shi und Massague 2003). Bis heute wurden in Säugetieren sieben Typ-1-Rezeptoren und fünf Typ-2-Rezeptoren identifiziert. Zu den Typ-II-Rezeptoren gehören der Aktivin-Rezeptor-Typ-II und der Aktivin-Rezeptor-Typ-IIB (AktR-II und AktR-IIB), der TGF- β -Typ-II-Rezeptor (T β R-II), der MIS-Typ-II-Rezeptor (MISR-II) und der BMP-Typ-II-Rezeptor (BMPR-II). Die Typ-I-Rezeptoren werden als Activin-like kinases (ALKs) bezeichnet. Unter den Typ-I-Rezeptoren ALK1 bis ALK7 wurden bisher drei Rezeptoren als BMP-bindend beschrieben, nämlich ALK2, ALK3 (auch BMPR-IA genannt) und ALK 6 (auch BMPR-IB) (Koenig et al. 1994, ten Dijke et al. 1994).

Die Mitglieder der BMP-Familie binden dabei mit unterschiedlicher Affinität an verschiedene Kombinationen von Typ-1- und Typ-2-Rezeptoren. Dies unterstützt die Annahme, dass die Affinität der BMPs zu den Rezeptoren bedeutsam für die Aktivierung der intrazellulären Signalkaskade ist (Nohe et al. 2004). Daraus ergeben sich komplexe Beziehungen zwischen den Liganden, den Rezeptoren und den Corezeptoren als auch den Smads als intrazelluläre Signalmoleküle, die in **Abb. 2** dargestellt sind (Shimasaki et al. 2004, Massague 2008).

B	Ligand	Receptor II	Receptor I	Coreceptor	Smad
TGF β	TGF- β 1,2,3	T β R-II	T β R-I	Betaglycan	Smad2,3 with Smad4
	Activin-A,B,C	ActR-IIA,B	ALK4		
	Myostatin	ActR-IIA,B	ALK4		
	Nodal	ActR-IIA,B	ALK4,7	Cripto	
	GDF-1,3	ActR-IIA,B	ALK4,7	Cripto	
	Inhibin	ActR-IIA,B	—	Betaglycan	
	Lefty-1,2	ActR-IIA,B	—	Cripto	
BMP	BMP-2,4	BMPr-II, ActR-II	BMPr-IA,B	RMG-a,b,c	Smad1,5, 8 with Smad4
	BMP-5,6,7	BMPr-II, ActR-II	BMPr-IA, ALK2		
	BMP-9,10	BMPr-II, ActR-II	ALK1	Endoglin	
	GDF-5,6,7	BMPr-II, ActR-II	BMPr-IA,B		
	AMH/MIS	AMHR-II	BMPr-IA, ALK2		

Abb. 2 Darstellung der Beziehungen zwischen Liganden, Rezeptoren, Corezeptoren und Smads im TGF- β -System (grün) und im BMP-System (blau) (Massague 2008)

Trotz der vergleichbaren Mechanismen der Signaltransduktion der Mitglieder der TGF- β -Superfamilie über Serin-/Threonin-Kinase-Rezeptoren ergeben sich Unterschiede in der Bindung der Liganden TGF- β und Aktivin und den BMPs an die Rezeptoren. Sowohl TGF- β als auch Aktivin können in Abwesenheit des Typ-1-Rezeptors an den Typ-2-Rezeptor binden, während die Bindung der Liganden an den Typ-1-Rezeptor nur bei Anwesenheit des Typ-2-Rezeptors möglich ist. Gegensätzlich verhält es sich bei der Bindung der BMPs an die Rezeptoren. In diesem System ist auch bei Abwesenheit des Typ-2-Rezeptors die Bindung der BMPs an den Typ-1-Rezeptor möglich, die Affinität der Rezeptorbindung wird jedoch durch die Präsenz des Typ-2-Rezeptors zusätzlich verstärkt (Koenig et al. 1994, ten Dijke et al. 1994). Zur Aktivierung binden die BMP-Homodimere parallel sowohl an den Typ-II- als auch an den Typ-I-Rezeptor. Dies stellt eine weitere Besonderheit der BMP-Signaltransduktion dar. Bei den TGF- β s zum Beispiel findet diese Bindung zeitversetzt statt (Liu et al. 1995).

Unabhängig vom Bindungsmodus phosphoryliert der konstitutiv aktive Typ-2-Rezeptor, im Zuge der durch die Liganden induzierten Formation eines heteromeren Komplexes, den Typ-1-Rezeptor in seiner GS-Domäne, einer Glycin- und Serin-reichen Domäne. Dies führt zu einer Konformationsänderung und Aktivierung des Typ-1-Rezeptors, welcher das Signal via Phosphorylierung spezifischer, intrazellulärer Moleküle weiterleitet (Wrana et al. 1994, ten Dijke et al. 1996). Vor dem Hintergrund dessen wird angenommen, dass der Typ-1-Rezeptor die Spezifität des Signals determiniert (Derynck und Feng 1997, Massague 1998). Als zyttoplasmatische Mediatoren gelten die Smad-Proteine (Mad-Gen (Mothers against decapentaplegic) aus *Drosophila* und verwandte Sma-Gene aus *C. elegans* (Attisano und Wrana 2000). In Säugetieren wurden bis heute acht Sma/Mad-verwandte Proteine identifiziert, die deswegen auch den Namen Smad tragen (Heldin et al. 1997, Massague 1998). Auf Grund ihrer Funktion und Struktur werden die Smads in drei Untergruppen

eingeteilt. Hierbei unterscheidet man R-Smads (Rezeptor-regulierte Smads), Co-Smads (common-mediator Smads) und I-Smads (inhibitorische Smads). Smad-Proteine besitzen mit ihrer Mad-Homology 1 Domäne (MH1) und ihrer Mad-Homology 2 Domäne (MH2) zwei hochkonservierte Domänen an ihrem N- und C-terminalen Ende. Bei den R-Smads handelt es sich um Rezeptor-regulierte Smads. Diese interagieren über die MH2-Domäne mit dem Typ-1-Rezeptor, durch dessen Serin-/Threonin-Kinase sie in einem SSXS-Motiv direkt phosphoryliert werden. Während Smad1, Smad5 und Smad8 die intrazellulären Mediatoren des BMP-Signalwegs darstellen, werden Smad2 und Smad3 durch TGF- β und Aktivin aktiviert. Im Zuge der Aktivierung bilden die R-Smads über die MH2-Domäne hetero-oligomere Komplexe mit den Co-Smads, sogenannten „common-mediator“ Smads, aus. Smad4 gilt dabei als allgemeiner Bindungspartner für alle R-Smads. Der hetero-oligomere Komplex transloziert schließlich in den Zellkern. Dort entfalten die Smad-Proteine ihre transkriptionelle Aktivität, indem sie direkt oder indirekt an die DNA binden und die Transkription verschiedener Zielgene regulieren. Smad6 und Smad7 zählen zu den I-Smads, sogenannte inhibitorische Smads. Diese regulieren negativ den Signalweg der TGF- β -Superfamilie (**Abb. 3**) (Kawabata et al. 1999). Bei der BMP-Signaltransduktion spielen ebenfalls Smad-unabhängige Signalwege eine wichtige Rolle, die die BMP-Wirkung und die Smad-Signale modulieren (Mulder 2000). Dabei sind die Smad-Proteine nicht nur Substrate der TGF- β -/BMP-Rezeptor-Kinasen, sondern können auch durch MAP-Kinasen (Mitogen-aktivierte Protein-Kinasen) phosphoryliert werden (Javelaud und Mauviel 2005).

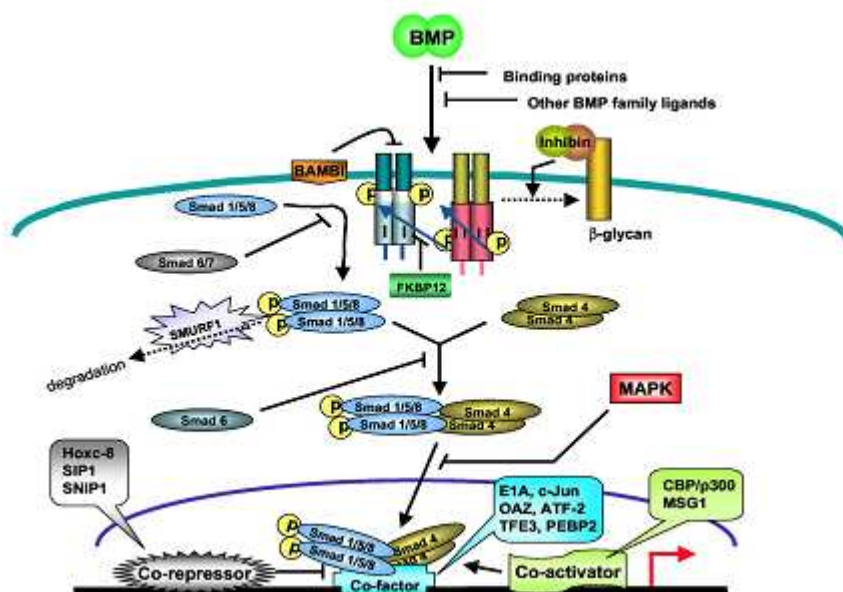


Abb. 3 BMP-Signalweg (Shimasaki et al. 2004)

Gleichzeitig wird der BMP-Signalweg durch „cross-talks“ zwischen den Smads und den Signalmolekülen der MAP-Kinasen, beispielsweise durch ERK1/2 (Extracellular Signal-Regulated Kinase), p38 und JNK, moduliert (Shimasaki et al. 2004). Ebenso wurden Interaktionen zwischen dem BMP-Signalweg und den Signalwegen von TGF- β /Aktivin, Wnt, Ca²⁺/Calmodulin und JAK-STAT beschrieben (von Bubnoff und Cho 2001). Einige dieser Signalwege (**Abb. 1**) sind dabei unter anderem in der Entwicklung und Progression des hepatozellulären Karzinoms relevant (Avila et al. 2006).

1.4.2 Modulation der Signaltransduktion

In den vergangenen Jahren konnte gezeigt werden, dass der BMP-Smad-Signalweg einer negativen Autoregulation unterliegt, die sowohl auf extra- als auch auf intrazellulärer Ebene stattfindet und die Dauer und die Intensität der BMP-Signale moduliert (von Bubnoff und Cho 2001). Dabei kann die BMP-Aktivität durch verschiedene Mechanismen reguliert werden: 1. Blockade der BMPs durch extrazelluläre BMP-Antagonisten 2. Expression dominant-negativer, nicht signalgebender Pseudorezeptoren, 3. Blockade des BMP-Signals durch inhibitorische Smads, 4. Regulation des BMP-Signals durch intrazelluläre Smad-bindende Proteine, Co-Repressoren und Co-Aktivatoren und 5. Ubiquitinierung und Degradation von Smads über Smurfs (Canalis et al. 2003).

Extrazellulär können die Effekte der BMPs durch eine Gruppe sezernierter Polypeptide moduliert werden, die das BMP-Signal limitieren und gleichfalls durch BMPs induziert werden können. Diese extrazellulären Antagonisten verhindern die BMP-Signalweiterleitung durch direkte und spezifische Bindung der BMPs an den membranständigen Rezeptor. Bei diesen Modulatoren handelt es sich um Noggin, Chordin, Follistatin und Follistatin-related-gene (FLRG), Ventroptin, twisted gastrulation (Tsg) und um die Gene der Dan/Cerebrus-Familie, die das Motiv eines konservierten Cysteinknotens teilen (Miyazono 2000, Canalis et al. 2003). BAMBI (BMP and Activin Membrane Bound Inhibitor) wurde als Inhibitor des BMP-Signalwegs während der Embryonalentwicklung des *Xenopus* identifiziert. Dieser nicht signalgebende Pseudorezeptor für Serin-/Threonin-Kinasen besitzt strukturelle Ähnlichkeit mit den Typ-1-Rezeptoren, jedoch weist er keine intrazelluläre Domäne mit Kinaseaktivität auf. In Verbindung mit den Rezeptoren der TGF- β -Superfamilie fungiert BAMBI als dominant negativer Rezeptor. Durch Verhindern der Formation funktionaler Rezeptorkomplexe werden die Signale der TGF- β -Superfamilie inhibiert (Onichtchouk et al. 1999). Im Zuge der Autoregulation des BMP-Signalwegs wird die Expression von BAMBI durch BMPs induziert, während gleichzeitig der BMP-Smad-Signalweg durch Hemmung der

Signalweiterleitung negativ reguliert wird (Miyazono 2000). Intrazellulär werden die BMP-Signale unter anderem durch Smad6 und Smad7, die als inhibitorische Smads gelten, beeinflusst. I-Smads gelten als potente Inhibitoren der TGF- β s, der Aktivine und der BMPs. Dabei blockieren sie sowohl die Phosphorylierung Rezeptor-regulierter Smads und deren Interaktion mit den Typ-1-Rezeptoren als auch die Heterodimerisierung von R-Smads und Smad4 (von Bubnoff und Cho 2001, Miyazono et al. 2005). Über Interaktionen mit den R-Smads und I-Smads inhibiert auch Tob, ein Smad-bindendes Protein, das BMP-Signal (Yoshida et al. 2003). Im Zellkern kann die Signalübertragung über transkriptionelle Co-Repressoren gehemmt oder durch Co-Aktivatoren verstärkt werden. Zu den Co-Repressoren zählen unter anderem Ski und SnoN, die durch Induktion der Deacetylierung von Histonen die Transkription von Zielgenen hemmen (Miyazono et al. 2005). Smads werden zusätzlich über den Ubiquitin-Proteasom-Signalweg sowohl Liganden-abhängig als auch Liganden-unabhängig degradiert. Die Ubiquitinierung der Proteine wird dabei über E1 Ubiquitin-aktivierende Enzyme, E2-Ubiquitin-konjugierende Enzyme und E3 Ubiquitin-Ligasen vermittelt (Miyazono 2000). Smurf1 (Smad ubiquitination regulatory factor-1) ist eine E3 Ubiquitin-Ligase der Hect-Familie (homologous to E6-associated protein C terminus) und führt, abhängig von der BMP-Rezeptor-Aktivierung, über spezifische Interaktionen mit Smad1 und Smad5 zu deren proteasomaler Degradation durch Ubiquitinierung (Zhu et al. 1999). Die Wirkung der Smurfs wird dabei nicht nur auf Ebene der R-Smads, sondern ebenfalls auf Rezeptorebene vermittelt, indem die BMP-Rezeptor-Komplexe über die Bindung von Smad6 herunterreguliert werden (von Bubnoff und Cho 2001).

Mit der Entdeckung von Dorsomorphin wurde ein neues, den BMP-Signalweg inhibierendes, kleines Molekül identifiziert. Dorsomorphin beeinflusst regulatorisch über eine selektive Hemmung der Kinasefunktion von Typ-1-BMP-Rezeptoren und über eine Blockade der BMP-vermittelten Smad1/5/8-Phosphorylation die BMP-Signalkaskade. Die Spezifität dieses Moleküls besteht dabei in der Inhibition des Smad-abhängigen Signalwegs, während Smad-unabhängige Signalkaskaden über MAPK (Mitogen-aktivierte Protein-Kinasen) unbeeinflusst bleiben (Yu et al. 2008).

1.4.3 BMPs im Tumorgeschehen

BMPs regulieren als multifunktionale Zytokine eine Reihe wichtiger zellulärer Prozesse (ten Dijke et al. 2002, Park 2005). Dabei handelt es sich um Prozesse, die nicht nur während der Embryogenese von großer Bedeutung sind, sondern auch während der Entwicklung und Progression von Tumoren eine entscheidende Rolle spielen. Die Expression verschiedener

BMPs, ihrer Rezeptoren und von Molekülen der Signaltransduktion wurde dementsprechend bereits in einer Vielzahl humaner Tumoren dokumentiert. Sie sind unter anderem im Ösophaguskarzinom (Raida et al. 1999), im Mammakarzinom (Arnold et al. 1999, Clement et al. 2000, Katsuno et al. 2008, Alarmo et al. 2009), in Glioblastomen (Piccirillo und Vescovi 2006), in Sarkomen (Guo et al. 1999), im Pankreaskarzinom (Kleeff et al. 1999, Gordon et al. 2009), im Prostatakarzinom (Ide et al. 1997, Masuda et al. 2003, Ye et al. 2007, Darby et al. 2008), in Tumoren der Speicheldrüsen (Hatakeyama et al. 1994, Kusafuka et al. 1998), in Osteosarkomen (Jin und Yang 1990, Gobbi et al. 2002), im kolorektalen Karzinom (Hardwick et al. 2008, Motoyama et al. 2008, Loh et al. 2008), im Ovarialkarzinom (Theriault et al. 2007, Shepherd et al. 2008), im Zervixkarzinom (Cassar et al. 2008), im Melanom (Hsu et al. 2005) oder auch im Bronchialkarzinom (Langenfeld et al. 2005) nachweisbar.

Die BMPs führen dabei durch ihre pro- und antitumorigene Wirkung zu komplexen und mitunter gegensätzlichen Effekten in der Karzinogenese. Während ihre Signale die Tumorgenese verschiedener Malignome, einschließlich Hirntumore, Basalzellkarzinome der Haut und Magenkarzinome, inhibieren (Piccirillo et al. 2006, Sneddon et al. 2006, Bleuming et al. 2007), werden die Motilität und die Invasivität, beispielsweise im Kolonkarzinom, im Melanom und im Prostatakarzinom, durch die BMP-Wirkung begünstigt (Rothhammer et al. 2005, Yang et al. 2005, Grijelmo et al. 2007).

Während BMP-Signale eine kritische Rolle in der Hepatogenese spielen (Rossi et al. 2001), liegen zur Expression und tumorbiologischen Relevanz der BMPs im hepatozellulären Karzinom, im Gegensatz zu TGF- β , bisher nur wenige Befunde vor. So wurden Mutationen von Smad2 und Smad4 im HCC beobachtet (Yakicier et al. 1999). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass inhibitorische BMP-7-Signale durch in HCCs überexprimiertes Glypican-3 unterdrückt und negativ reguliert werden (Midorikawa et al. 2003). BMP-2 wurde als negativer Regulator der Proliferation von Hepatozyten beschrieben (Xu et al. 2006). Auf Grund der Vielzahl von Ergebnissen bei anderen Tumorentitäten liegt die Vermutung nahe, dass weitere Mitglieder des BMP-Netzwerkes und BMP-Signalsystems ebenso in der Karzinogenese des HCCs beteiligt sind.

1.5 Proteinase-aktivierte Rezeptoren (PARs)

Die Suche nach einem funktionellen Thrombinrezeptor, der für die aggregatorischen und mitogenen Wirkungen des Thrombins verantwortlich ist, führte zur Klonierung eines G-Protein gekoppelten Rezeptors, der heute als Proteinase-aktivierter Rezeptor 1 (PAR₁)

(Rasmussen et al. 1991, Vu et al. 1991a) bezeichnet wird. Er gilt als Prototyp für eine kleine Untergruppe der G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Bis heute wurden vier Proteinase-aktivierte Rezeptoren identifiziert, die entsprechend der Reihenfolge ihrer Entdeckung als PAR₁ bis PAR₄ (Rasmussen et al. 1991, Vu et al. 1991a, Nystedt et al. 1994, Ishihara et al. 1997, Xu et al. 1998) benannt sind. PAR₁, PAR₃ und PAR₄ können in erster Linie durch Thrombin aktiviert werden. PAR₁ kann jedoch auch durch Streptokinase, Plasmin (Kuliopulos et al. 1999), Faktor Xa (McRedmond et al. 2000, Riewald und Ruf 2001), aktiviertes Protein C (Riewald et al. 2002) sowie durch Trypsin und die Matrixmetalloprotease 1 (Boire et al. 2005) aktiviert werden. Im Vergleich zu Thrombin sind jedoch wesentlich höhere Konzentrationen für eine Rezeptoraktivierung notwendig, so dass eine Bedeutung dieser Proteinasen als Rezeptoragonisten in vivo fraglich ist (Hollenberg und Compton 2002, Ossovskaya und Bunnett 2004, Boire et al. 2005). Eine PAR₄-Spaltung und Aktivierung ist auch für Trypsin, Cathepsin G und die Gerinnungsfaktoren VIIa und Xa beschrieben (Hollenberg und Compton 2002). PAR₂ kann nicht durch Thrombin aktiviert werden, sondern ist Target für Trypsin, Mastzell-Tryptase, Matriptase1, Tissue Factor/Gerinnungsfaktor VIIa/Gerinnungsfaktor Xa sowie Kallikreine (Steinhoff et al. 2005, Ramachandran und Hollenberg 2008).

1.5.1 PAR₁

Der Proteinase-aktivierte Rezeptor 1 (Rasmussen et al. 1991, Vu et al. 1991a) reguliert neben der Thrombozytenaggregation sowohl die Sekretion als auch endotheliale, zelluläre Funktionen (Coughlin 2000). Seine Aktivierung führt in Gefäßen zu einer Endothel-abhängigen und NO-vermittelten Vasodilatation (Muramatsu et al. 1992, Hollenberg et al. 1997). Des Weiteren besitzt er regulatorische Funktionen in der Embryonalentwicklung (Griffin et al. 2001), im Prozess der Restenose nach Gefäßschädigung (Andrade-Gordon et al. 2001) und bei neurogenen, inflammatorischen Prozessen (Macfarlane et al. 2001, Vergnolle et al. 2001).

1.5.2 PAR₂

Der Proteinase-aktivierte Rezeptor 2 (Nystedt et al. 1994) spielt, ebenso wie PAR₁, eine Rolle im kardiovaskulären System (Hollenberg 2003). Gegenüber PAR₁, der sowohl inflammatorische und anti-inflammatorische Funktionen besitzt, scheint PAR₂ primär proinflammatorisch wirksam zu sein (Vergnolle et al. 2001). In den Atemwegen werden über PAR₂ protektive Effekte vermittelt (Cocks und Moffatt 2000). In der Niere führt seine Aktivierung zur Vasodilatation und Erhöhung der glomerulären Filtrationsrate (Gui et al.

2003). Des Weiteren besitzt er physiologische Funktionen im gastrointestinalen System, in der Haut und in peripheren Nerven (Kanke et al. 2005).

1.5.3 PAR₃

Der Proteinase-aktivierte Rezeptor 3 (Ishihara et al. 1997) wird in einer Vielzahl von Geweben, einschließlich Herz, Leber, Pankreas, Magen, Knochenmark und in vaskulären, endothelialen Zellen, exprimiert (Derian et al. 2002). Was seine physiologische Rolle betrifft, so liegen gegenwärtig wenige Kenntnisse vor. Er gilt jedoch als Cofaktor für den Proteinase-aktivierten Rezeptor 4 (Nakanishi-Matsui et al. 2000, Sambrano et al. 2001).

1.5.4 PAR₄

Der Proteinase-aktivierte Rezeptor 4 (Xu et al. 1998) ist gemeinsam mit PAR₁ an der Regulation der Thrombozytenaktivierung beteiligt (Coughlin 2000). Weitere Studien indizieren ebenso PAR₄ vermittelte Effekte im vaskulären und im gastrointestinalen System (Hollenberg et al. 1999).

1.5.5 Mechanismen der Rezeptoraktivierung

Proteinase-aktivierte Rezeptoren besitzen einen ungewöhnlichen Aktivierungsmechanismus, der sie von anderen G-Protein gekoppelten Rezeptoren unterscheidet. Dieser besteht in einer proteolytischen Demaskierung einer PAR-Subtyp-spezifischen, N-terminalen Rezeptorsequenz, die als so genannter „thethered ligand“ („gebundener Ligand“) an den eigenen Rezeptor bindet und die intrazelluläre Signalweiterleitung über eine G-Proteinkopplung initiiert (Hollenberg und Compton 2002, Coughlin 2005, Steinhoff et al. 2005). Da dieser Mechanismus für PAR₁ am intensivsten untersucht und am besten aufgeklärt wurde, soll seine Erläuterung detailliert erfolgen. Eine schematische Darstellung findet sich in **Abb. 4**. Thrombin bindet in einem ersten Schritt im N-terminalen Bereich des Rezeptors. Durch proteolytische Spaltung zwischen den Aminosäuren Arginin41 und Serin42 entsteht ein neuer NH₂-Terminus. Dieser interagiert als gebundener Ligand mit dem zweiten extrazellulären Loop des Rezeptors, so dass es zu einer Konformationsänderung kommt und nachfolgend durch Aktivierung von G-Proteinen die intrazelluläre Signalweiterleitung initiiert wird (Vu et al. 1991b, Gerszten et al. 1994, Nanevycz et al. 1995, Hollenberg und Compton 2002). Neben dieser Aktivierung durch proteolytische Spaltung des Rezeptors durch Serinproteinasen können PARs auch durch synthetische Peptide aktiviert werden. Diese sind in ihrer Sequenz von den ersten 5- 14 Aminosäuren des gebundenen Liganden abgeleitet (PAR₁-AP: SFLLR – SFLLRNPNDKYEPF; PAR₄-AP: GYPGQV - GYPGQVCANDSDTL).

Dabei kommt es durch die Wechselwirkung dieser PAR-aktivierenden Peptide (PAR-APs) mit dem zweiten extrazellulären Loop des Rezeptors zu dessen Aktivierung, ohne dass es einer Spaltung des Rezeptors bedarf (Vu et al. 1991a, Faruqi et al. 2000, Hollenberg und Compton 2002). Dieses Konzept konnte für PAR₁, PAR₂ und PAR₄ gezeigt werden, es gilt jedoch nicht für PAR₃, da PAR₃-analoge Peptide keine Aktivierung von PAR₃ induzieren (Ishihara et al. 1997), sondern eine Aktivierung von PAR₁ oder PAR₂ bewirken (Hansen et al. 2004, Kaufmann et al. 2005).

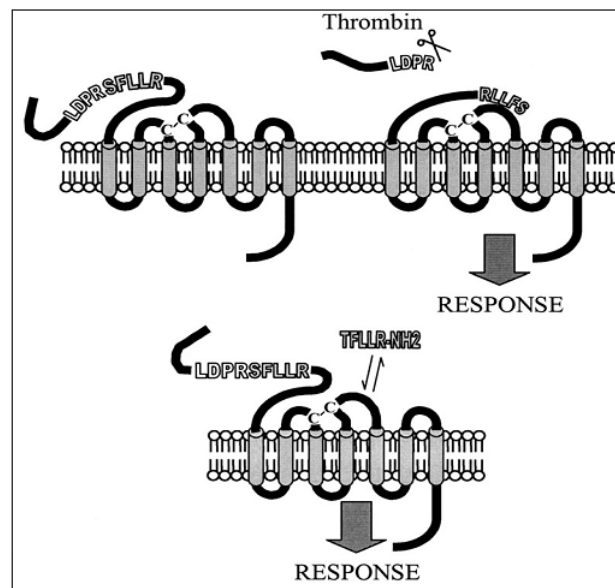


Abb. 4 Schematische Darstellung der Aktivierung von PAR₁ (Hollenberg und Compton 2002)

1.5.6 Signalweiterleitung über G-Proteine

Die Signalweiterleitung der PARs wird über multiple G-Proteine vermittelt (Macfarlane et al. 2001, Steinhoff et al. 2005). G-Proteine sind membranständige Heterotrimere, die aus einer α -, einer β - und einer γ -Untereinheit bestehen. Dabei bilden die β - und γ -Untereinheit eine funktionelle Einheit (Hepler und Gilman 1992). Sowohl die $G\alpha$ -Untereinheit als auch der $G\beta\gamma$ -Komplex sind in der Lage, intrazelluläres Signaling zu vermitteln (Neves et al. 2002). Die $G\alpha$ -Untereinheiten werden mit G_s , G_q , G_i und $G_{12/13}$ in vier Gruppen unterteilt (Hepler und Gilman 1992).

PAR₁ interagiert mit verschiedenen α -Untereinheiten, insbesondere $G_{q11}\alpha$, $G_{12/13}\alpha$ und $G_i\alpha$. Durch seine Interaktion mit $G_{q11}\alpha$ wird unter anderem die Phospholipase C- β_1 (PLC β) aktiviert. Über die Generierung von InsP₃ werden intrazelluläres Ca²⁺ und Diacylglycerol (DAG) mobilisiert und die Proteinkinase C (PKC) aktiviert. Über intrazelluläres Ca²⁺ und PKC werden zahlreiche Signalwege, einschließlich Kalzium-regulierter Proteinkinasen und Phosphatasen und Mitogen-aktivierte Protein-Kinasen, unter anderem ERK, induziert

(Ossovszkaya und Bunnett 2004, Coughlin 2000). Über eine Kopplung an $G_{12/13\alpha}$ reguliert PAR_1 z.B. sowohl die Zellform von Thrombozyten als auch die Permeabilität und die Migration endothelialer Zellen. Als Folge der Kopplung von PAR_1 mit $G_{i\alpha}$ kommt es zur Hemmung der Adenylatzyklase und somit zu einer Verminderung von cAMP. PAR_1 ist auch durch Kopplung an $G\beta\gamma$, unter anderem über eine Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) mit nachfolgender Stimulation von p42/p44-MAP-Kinasen (Wang et al. 2002), an der intrazellulären Signalweiterleitung beteiligt. Zudem ist PAR_1 z.B. in Enterozyten und in Nierenkarzinomzellen in der Lage, eine Phosphorylierungsaktivierung des EGF-Rezeptors (Epidermal Growth Factor Rezeptor) über eine sogenannte Rezeptor-Transaktivierung mit nachfolgender Aktivierung der p38-MAPK bzw. der p42/p44-MAPK zu vermitteln (Buresi et al. 2002, Sabri et al. 2002).

Die Aktivierung von PAR_2 führt zu einem Anstieg des intrazellulären Kalzium-Spiegels. Es wird vermutet, dass die PAR_2 -Signale über $G_q\alpha$ und $G_{i\alpha}$ vermittelt werden (Macfarlane et al. 2001). Ein weiterer, wichtiger Aspekt der Zellaktivierung über PAR_2 betrifft die Fähigkeit dieses Rezeptors zu einer Arrestin-vermittelten und G-Protein-unabhängigen Signalweiterleitung (Zoudilova et al. 2007). In glatten Muskelzellen und in neuronalen Zellen wurde die Aktivierung der Phospholipase C (Berger et al. 2001) und der Proteinkinase C (Okamoto et al. 2001) beschrieben. Des Weiteren aktiviert der Rezeptor MAPK wie ERK 1/2 und p38 (Ramachandran und Hollenberg 2008).

Die Rolle des PAR_3 ist nicht vollkommen geklärt. PAR_3 ist nicht in der Lage, ein eigenes intrazelluläres Signal zu generieren, er dient jedoch als Cofaktor für PAR_4 (Nakanishi-Matsui et al. 2000, Sambrano et al. 2001).

PAR_4 vermittelt Signale über eine G_q -Kopplung. Eine $[Ca^{2+}]_i$ -Mobilisierung (Kahn et al. 1998, Xu et al. 1998, Camerer et al. 2002) und eine Aktivierung von MAP-Kinasen wurde in glatten Gefäßmuskelzellen beobachtet (Bretschneider et al. 2001). Zudem wurde sowohl eine Src-abhängige Phosphorylierung von p38 und die Aktivierung von ERK und der PLC in Kardiomyozyten (Sabri et al. 2003) als auch eine p38-Aktivierung in Endothelzellen (Fujiwara et al. 2005) beschrieben.

1.5.7 PARs im Tumorgeschehen

Im Tumorgeschehen und der Invasion der Extrazellulärmatrix spielen Proteinasen eine essentielle Rolle. Aus diesem Grund erfolgte eine Vielzahl von Studien zur Untersuchung der Beteiligung von PARs während der Tumordinvasion und an metastatischen Prozessen (Kamath et al. 2001). Im Jahr 1995 wurde bereits die Expression von PAR_1 in Sarkom- und

Melanomzellen der Maus nachgewiesen (Wojtukiewicz et al. 1995). Ebenso wurde PAR₁ im Pankreaskarzinom lokalisiert (Rudroff et al. 1998). In Zellen des Mammakarzinoms korreliert die PAR₁-Expression unter anderem mit dem Grad der Invasivität (Even-Ram et al. 1998). Sowohl protumorigene als auch antitumorigene Effekte verschiedener Proteinase-aktivierter Rezeptoren konnten in weiteren Tumorentitäten nachgewiesen werden, so im Pankreaskarzinom (Shimamoto et al. 2004, Yada et al. 2005), im Kolonkarzinom (Nishibori et al. 2005, Darmoul et al. 2004), im Prostatakarzinom (Kaushal et al. 2006, Liu et al. 2006, Black et al. 2007), im Magenkarzinom (Fujimoto et al. 2006, Caruso et al. 2006), im Lungenkarzinom (Ghio et al. 2006), im Endometriumkarzinom (Jahan et al. 2007a), im Ovarialkarzinom (Jahan et al. 2007b), im Nierenzellkarzinom (Bergmann et al. 2006) und im Melanom (Tellez et al. 2003). In Untersuchungen zur Funktion von PARs im hepatozellulären Karzinom konnten PAR₁, PAR₃ und PAR₄ in HCC-Zelllinien und in Primärkulturen von chirurgisch entfernten HCCs auf RNA- und Proteinebene nachgewiesen werden. Zudem wurde gezeigt, dass die durch Thrombin gesteigerte Migration von HCC-Zellen über eine Aktivierung von PAR₁ und PAR₄ vermittelt wird (Kaufmann et al. 2007).

Insgesamt ergaben die bisherigen Untersuchungen an Zellen verschiedener Tumorentitäten, dass die über das Thrombin-/PAR-System vermittelte Signalweiterleitung zu ganz unterschiedlichen Effekten auf zellulärer Ebene führen kann. So kann nicht von einer einheitlichen Funktion dieser Proteinase-Rezeptorsysteme im Tumor ausgegangen werden. Dies unterstreicht die in der Tumorforschung inzwischen gut akzeptierte Vorstellung, dass jeder Tumor seine spezifische Biologie entwickelt und erfordert demzufolge eine Evaluierung der PAR-Funktion für jede Tumorart.

1.6 Met-Rezeptor

Der Met-Rezeptor gilt als Prototyp einer kleinen Subfamilie von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) (Furge et al. 2000) und wurde ursprünglich als ein konstitutiv aktives Onkogen in einer Osteosarkom-Zelllinie identifiziert (Cooper et al. 1984, Park et al. 1986). Durch die Bindung des natürlichen Ligandens, des Hepatocyte Growth Factors (HGF)/scatter factors, werden über den Met-Rezeptor multiple biologische Funktionen wie Zellproliferation, Invasion, Migration, Morphogenese und Überleben epithelialer Zellen reguliert (Birchmeier et al. 2003, Zhang und Vande Woude 2003, Rosario und Birchmeier 2003). Met wird vor allem in epithelialen Zellen exprimiert, jedoch auch in vaskulären und lymphatischen, endothelialen Zellen, in neuralen Zellen und in hämatopoetischen Zellen (You und McDonald 2008).

1.6.1 Struktur des Met –Rezeptors

Der Met-Rezeptor besteht aus einer einzelnen transmembranalen β -Untereinheit von 145 kDa, die über Disulfidbrücken an eine α -Kette gebunden ist (Chan et al. 1988, Giordano et al. 1989, Park et al. 1987). Der extrazelluläre Teil von Met, der für die Bindung von HGF verantwortlich ist, besteht aus einer Sema-Domäne (Homolog zu Semaphorinen), einer Cystein-reichen Met-related-sequence (MRS)-Domäne und vier Immunglobulin-ähnlichen Strukturen (IgG-Domäne). Der intrazelluläre, für die Signaltransduktion verantwortliche Teil des Rezeptors ist aus einer juxtamembranen Domäne, einer Domäne mit Tyrosin-Kinase-Aktivität und einem C-terminalen, regulatorischen Anteil aufgebaut. In der Tyrosin-Kinase-Domäne regulieren zwei Tyrosin-Reste (Tyr 1234 und Tyr 1235) die Aktivität von Met, während zwei weitere, im regulatorischen C-Terminus lokalisierte Tyrosin-Reste (Tyr 1349 und Tyr 1356) wichtige Adaptermoleküle für die intrazelluläre Signalweiterleitung rekrutieren. Durch die Fähigkeit des C-terminalen Endes der β -Kette, eine Vielzahl von sogenannten Adaptermolekülen zu binden, wird diese als „multisubstrate docking site“ bezeichnet (You und McDonald 2008).

1.6.2 Signalweiterleitung

Nach Ligandenbindung dimerisiert der Met-Rezeptor. Durch Autophosphorylierung der Tyrosin-Reste Tyr 1234 und Tyr 1235 in der katalytischen Domäne wird seine Tyrosin-Kinase-Aktivität stimuliert (Longati et al. 1994). Die Phosphorylierung zweier weiterer Tyrosin-Reste im C-terminalen Ende der β -Kette, Tyr 1349 und Tyr 1356, ist bedeutsam für die Rekrutierung intrazellulärer Adaptermoleküle. Diese interagieren über eine Src homologous 2 (SH2)-Domäne direkt mit der „multisubstrate docking site“ des Met-Rezeptors und binden über ihre Src homologous 3 (SH3)-Domäne Signal weiterleitende Moleküle (Gao und Vande Woude 2005). Zu den Adaptermolekülen zählen unter anderem growth factor receptor-bound protein (Grb) 2, STAT3, die p85-Untereinheit der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), Shc, die Phospholipase C- γ (PLC γ), c-Src, SHIP-1 und SHIP-2 und Gab1 (Bolanos-Garcia 2005). Über sie aktiviert das HGF/Met-Signal dementsprechend zahlreiche Signaltransduktionswege.

1.6.3 Met im Tumorgeschehen

Der Met-Rezeptor kontrolliert nicht nur Zellmigration und Wachstum in der Embryogenese, er kontrolliert auch Wachstum, Invasion und Metastasierung im Krebsgeschehen (Birchmeier et al. 2003, Trusolino und Comoglio 2002). Die Rolle des Met-Signalwegs wurde in einer

Vielzahl von Malignomen beschrieben, einschließlich in Tumoren des Dickdarms, des Magens, der Gallenblase, der Mamma, des Ovars, des Pankreas, der Niere, der Lunge, der Schilddrüse, der Prostata und in Sarkomen, in hämatologischen Tumoren, im Melanom und in Tumoren des zentralen Nervensystems. Dabei kann der Signalweg durch parakrine Signale, durch Überexpression der Liganden und/oder des Rezeptors, durch eine autokrine Loop-Formation und/oder Rezeptormutationen, durch Gen-Rearrangements und/oder Gen-Amplifikationen die Proliferation, das Überleben, die Motilität und die Invasion von Tumorzellen erhöhen (Peruzzi und Bottaro 2006).

1.7 Zielstellung

Da die therapeutischen Optionen für das HCC unzureichend sind, ist die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien im Sinne einer zielgerichteten Therapie dringend erforderlich. Für einen derartigen Ansatz wird die Identifizierung vielfältig veränderter, molekularer Mechanismen sowie in die Hepatokarzinogenese involvierter Signalwege und deren Interaktionen als eine entscheidende Voraussetzung für die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze für das HCC eingeschätzt.

Die Funktion von Bone Morphogenetic Proteins (BMPs), TGF- β -verwandten Wachstumsfaktoren, sowie von Proteinase-aktivierten Rezeptoren (PARs) konnte in der Karzinogenese und im Metastasierungsgeschehen verschiedener Tumoren nachgewiesen werden. Zur Expression und tumorbiologischen Relevanz der BMPs im HCC liegen nur wenige Befunde vor. Für die PARs, von denen in Untersuchungen der Arbeitsgruppe Kaufmann eine Funktion bei der Migration und Invasion dieser Zellen gezeigt werden konnte, lässt sich auf eine Beteiligung am HCC-Metastasierungsgeschehen schließen.

Im Rahmen der Promotionsarbeit soll untersucht werden, ob Interaktionen beider tumorigener Signalwege in etablierten Zelllinien des HCCs vorliegen.

Dabei sollen folgende Fragestellungen geklärt werden:

1. Wie werden Mitglieder des BMP-Netzwerkes in etablierten Zelllinien des hepatozellulären Karzinoms exprimiert?
2. Hat der BMP-Signalweg Einfluss auf den PAR-Pathway und umgekehrt, laufen diese Signalwege getrennt voneinander ab, antagonisieren sich diese oder gibt es Synergismen?
3. Welche Wirkungen gibt es auf Transkriptions- und auf Proteinebene?
4. Beeinflussen sich der BMP-Pathway und der Thrombin- /PAR-Signalweg in der Regulation wichtiger tumorbiologischer Prozesse wie z. B. der Migration?

2 Materialien

Die verwendeten Materialien wurden von diversen Firmen bezogen. Diese sind im Anhang aufgelistet. Eine reine Auflistung der verwendeten Chemikalien, der Laborgeräte und der Verbrauchsmaterialien findet sich ebenso im Anhang.

2.1 Zelllinien

Die verwendeten und in **Tab. 1** aufgelisteten Zelllinien wurden von DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) bezogen.

Tab. 1 Verwendete humane Zelllinien und deren Eigenschaften

Bezeichnung	Ursprung	Wachstum	Kultivierung
Hep3B	HCC	adhärent, monolayer	RPMI 1640, 10 % FCS (nicht hitzeinaktiviert)
HepG2	HCC	adhärent, monolayer	DMEM, 10 % FCS
Sk-Hep1	Aszites, Adenokarzinom	adhärent, monolayer	DMEM, 10 % FCS

2.2 Kulturmedien und Lösungen für die Zellkultur

Die in **Tab. 2** aufgelisteten Kulturmedien und Lösungen wurden in der Zellkultur eingesetzt.

Tab. 2 Verwendete Kulturmedien und Lösungen und deren Zusammensetzung

Bezeichnung	Zusammensetzung	Hersteller
DMEM (1X) (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	GlutaMAX I, 4500 mg/l Glucose, 110 mg/l Natriumpyruvat	[Invitrogen™]
RPMI 1640 (1X) (Roswell Park Memorial Institute)	Gluta MAX I, L-Alanyl-L-Glutamine	[Invitrogen™]
FCS		[Biochrom AG]
PBS		[Invitrogen™]
Trypsin-EDTA	Trypsin 0,25 %, EDTA 1 mM	[Invitrogen™]

2.3 Zusammensetzung von Puffern und Lösungen

Die **Tab. 3** zeigt die Komponenten und die Zusammensetzung von verwendeten Puffern und Lösungen.

Tab. 3 Verwendete Puffer und Lösungen und deren Zusammensetzung

Bezeichnung	Komponenten	Zusammensetzung
50x TAE-Puffer	Tris base	242 g
	Eisessig	57,1 ml
	EDTA	0,5 M, pH 8,0
	Aqua dest.	auffüllen auf 100 ml
5x Reaktionspuffer	Tris-HCl	250 mM, pH 8,3
	KCl	375 mM
	MgCl ₂	15 mM

Bezeichnung	Komponenten	Zusammensetzung
BSA-Lösung, Blockingpuffer (4 %)	BSA	4,0 g
	TBS-10X	10,0 ml
	Tween-20 (100 %)	100,0 µl
	Milli-Q-Wasser	90,0 ml
DNA-Ladungspuffer	Tris-HCl	10 mM, pH 8,5
	Na ₂ -EDTA	1 mM
	SDS	0,1 % (w/v)
	Glycerin	30 % (v/v)
	Bromphenolblau	0,005 % (w/v)
	Aqua dest.	auffüllen auf 100 ml
Einfriermedium für Zellen	DMEM	70 %
	FCS	20 %
	DMSO	10 %
Giemsalösung	Giemsapulver	100 mg
	Methanol	100 ml
Kollagenansatz	Kollagen	gelöst in
	Essigsäure	3,3 ml, 0,2 % (v/v), pH 3,0 davon 250 µl in 5 ml D-PBS
Laufpuffer	XT MES	25 ml
	Milli-Q-Wasser	475 ml
Proteinlysepuffer	HEPES (0,2 M)	20 mM, pH 7,5
	NaCl (1 M)	150 mM
	EDTA (0,1 M)	10 mM, pH 8,0
	EGTA (0,1 M)	2 mM, pH 8,0
	Triton-X-100 (10 %)	1 % (v/v)
	Na ₄ P ₂ O ₇ (0,1 M)	10 mM
	NaF (0,5 M)	50 mM
	Na ₃ VO ₄ (0,1 M, 15 min bei 95°C)	2 mM
	Milli-Q-Wasser	
	Aprotinin	10 µg/ml
	Pepstatin	1 µM
	Leupeptin	10 µM
	PefaBloc	500 µg/ml
SDS (20 %)	SDS-Pulver	20 g
	Aqua dest.	auffüllen auf 100 ml
Stripping-Puffer	β-Mercaptoethanol	50 mM
	SDS	2 %
	Tris-HCl	62,5 mM, pH 6,7
TBS-10X (pH 7,6)	Tris base	24,2 g
	NaCl	80,0 g
	Milli-Q-Wasser	auf 1000 ml auffüllen
TBS-T-Waschpuffer	TBS-10X	100 ml
	Tween-20 (100 %)	1,0 ml
	Milli-Q-Wasser	899 ml
Transferpuffer	Tris base	25 mM
	Glycin	192 mM
	Methanol (100 %)	20 %
	SDS (20 %)	2,5 ml
	Milli-Q-Wasser	auf 1000 ml auffüllen
Trypsin-EDTA	Trypsin	0,25 %
	EDTA	1 mM

2.4 Eingesetzte Kits

innuPREP RNA Mini Kit	[AnalytikJena]
LightCycler® 480 SYBR Green I Master	[Roche-Diagnostics]
LightCycler® FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green I	[Roche-Diagnostics]
Rneasy® MiniKit	[QIAGEN]

2.5 Primer für die RT-PCR und realtime-PCR

Primernamen	Sequenz (f-forward, r-reverse)	Produktgröße
beta-Aktin	f: CGG GAA ATC GTG CGT GAC AT r: GAA CTT TGG GGG ATG CTC GC	712 bp
BMP-2	f: TCA TAA AAC CTG CAA CAG CCA CAT CG r: GCT GTA CTA GCG ACA CCC AC	671 bp
BMP-3	f: CGC CAG GAG ATA CCT CAA GGT AGA r: TCA AAT GAG TTC TTT GCC AGG TTA TC	331 bp
BMP-5	f: CAT ATG AAT GCC ACC AAC CA r: GCA GCC ACA TGA GCG TAC TA	183 bp
BMP-6	f: GTC GTA ATC GCT CTA CCC AGT CC r: CTG GGT AAT AAG GCA CTG GCA TG	529 bp
BMP-7	f: CCT ACC CCT ACA AGG CCG TCT TC r: TGC TCC CCG TGG ACC GGA TGC TG	578 bp
BMPIR-IA	f: CGA AAA AGT GGC GGT GAA AG r: CAC CCT GGT ATT CAA GGG CA	441 bp
BMPIR-IB	f: AAG TTA CGC CCC TCA TTC r: TGA TGT CTT TTG CTC TGC	226 bp
BMPIR-II	f: GGG AGA AAT CAA AAG GGG ACA TA r: ACA GAA TGA GCA AGA CGG CAA GAG C	714 bp
AktR-IA	f: GCC CAA GGT CAA CCC CAA ACT CT r: GGA TTT TCC TTT AGT GGG CAG CT	265 bp
AktR-IB	f: ACC AGC TGC CTC CAG GCC AAC TA r: GTG CTC AGG CTC CTT GAG GTG AC	245 bp
AktR-IIA	f: GAA AAT GGG AGC TGC TGC AAA GTT G r: GTA GGC CAT CTT GTG ATG CCT GTA C	508 bp
AktR-IIB	f: AAC TGG GAG CTG GAG CGC ACC AAC r: GAA GTT GCC TTC GCA GCA GCA GAA	222 bp
Gremlin	f: ATG AGC CGC ACA GCC TAC AC r: TTA ATC CAA ATC GAT GGA TAT GC	533 bp
Noggin	f: GGA CGC GGG ACG AAG CAG CAG r: AGG ATC AAG TGT CCG GGT GC	779 bp
Dan	f: CGG GAT GGG CTC GCT GAA r: CAC CCC AGG CAG GAG GCA	270 bp
Chordin	f: CGA TGC TGT TCC CGC TGC r: GGA CAG AGG CCG AGG GTG	327 bp
ID-1	f: AAC CGC AAG GTG AGC AAG GTG G r: ACG CAT GCC GCC TCG GC	182 bp
ID-2	f: GAA AGC CTT CAG TCC CGT G r: TCA TGA ACA CCG CTT ATT CAG C	420 bp
VEGF	f: AAG GAG GAG GGC AGA ATC AT r: ATC TGC ATG GTG ATG TTG GA	225 bp
MET	f: CTC CTC TGG GAG CTG ATG AC r: GGA TAC GGA GCG ACA CAT TT	284 bp

Folgende Primer wurden von Invitrogen™ bezogen: beta-Aktin, BMP-2, BMP-3, BMP-5, BMP-6, BMP-7, BMPR-IA, BMPR-IB, BMPR-II, AktR-IA, AktR-IB, AktR-IIA und AktR-IIB, Gremlin, Noggin, Dan, Chordin, ID-1, ID-2 und VEGF.

Met wurde von Jena Bioscience, Jena bezogen.

2.6 Eingesetzte Peptide

Die in **Tab. 4** dargestellten Peptide wurden in den Inkubations- bzw. Migrationsversuchen zur Stimulation eingesetzt.

Tab. 4 Eingesetzte Peptide

Protein	Hersteller
humanes alpha-Thrombin (1 U/ml)	[Haemochrom Diagnostica Supplies]
rhALK3	Zur Verfügung gestellt von Dr. Peter Hortschansky (HKI, Jena).
rhNoggin	
rhBMP-2	
PAR ₁ -Agonist (TFLLRN-NH ₂)	Die Peptide wurden von Dr. Roland Kaufmann (AVC, Jena) in Zusammenarbeit mit Dr. Peter Henklein (Charité, Berlin) synthetisiert.
PAR ₂ -Agonist (2-furoyl-LIGRLO-NH ₂)	
PAR ₄ -Agonist (AYPGKF-NH ₂)	
Dorsomorphin	
	[Sigma]

2.7 Antikörper

Folgende Antikörper wurden bei den Proteinuntersuchungen eingesetzt.

2.7.1 Primäre Antikörper

Tab. 5 Eingesetzte primäre Antikörper

Bezeichnung	Hersteller
Smad1/5/8 (N-18)-R: sc-6031-R	Santa Cruz® Biotechnology
Phospho-Smad1(Ser463/465)/Smad5(Ser463/465)/Smad8 (Ser426/428) Antibody (pSmad1/5/8)	Cell Signaling Technology®
p44/42 MAPK (Erk1/2) Antibody	Cell Signaling Technology®
Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (E10)	Cell Signaling Technology®
Mouse mAB (pp44/42 MAPK)	
p38 MAP Kinase Antibody	Cell Signaling Technology®
Phospho-p38 MAP Kinase (Thr180/182) Antibody (pp38 MAPK)	Cell Signaling Technology®
Akt Antibody	Cell Signaling Technology®
Phospho-Akt (Ser473) Antibody (pAkt)	Cell Signaling Technology®
Met Antibody	Cell Signaling Technology®
Phospho-Met (Tyr1234/1235) Antibody (pMet)	Cell Signaling Technology®

2.7.2 Sekundäre Antikörper

Tab. 6 Eingesetzte sekundäre Antikörper

Bezeichnung	Hersteller
goat anti-rabbit IgG-HRP: sc-2030	Santa Cruz [®] Biotechnology
goat anti-mouse IgG-HRP: sc-2031	Santa Cruz [®] Biotechnology

2.8 PC-Programme

AIDA Image Analyser 3.52 (Luminescent Image Analysis System)

SPSS 15.0 für Windows

Softwareprogramme für LightCycler[®] und Mastercycler[®] ep realplex

3 Methoden

3.1 Zellkultur

Bei zellbiologischen Experimenten ist auf Sauberkeit und Keimarmut zu achten. Aus diesem Grund wurden alle Arbeiten mit Zellkulturen unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die benötigten Kulturmedien und Lösungen wurden steril vom Hersteller bezogen. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit. Als Zellkulturmedien dienten DMEM und 10 % für eine Stunde bei 56°C hitzeinaktiviertes FCS oder RPMI 1640 und 10 % nicht hitzeinaktiviertes FCS.

3.1.1 Zelllinien

3.1.1.1 Sk-Hep1

Die Zelllinie Sk-Hep1 wurde 1971 aus Aszites eines 52-jährigen Kaukasiers mit einem Adenokarzinom der Leber etabliert. Die epithelialen Zellen wachsen adhärent und als Monolayer. Die Kultivierung der Zelllinie erfolgte in 75 cm²-Zellkulturflaschen mit 15 ml DMEM und 10 % hitzeinaktiviertem FCS. Die Zelllinie wurde alle zwei bis drei Tage im Verhältnis 1:5 bis 1:7 passagiert.

3.1.1.2 HepG2

Die Zelllinie HepG2 wurde 1975 aus Tumorgewebe eines 15-jährigen Kaukasiers mit hepatozellulärem Karzinom etabliert. Die epitheliale Zelllinie wächst als Monolayer.

Die Kultivierung der adhärent wachsenden HepG2-Zellen erfolgte in 75 cm²-Zellkulturflaschen mit 15 ml DMEM und 10 % hitzeinaktiviertem FCS. Die Zelllinie wurde alle zwei bis drei Tag im Verhältnis 1:3 bis 1:7 passagiert.

3.1.1.3 Hep3B

Die Zelllinie Hep3B wurde 1976 aus Tumorgewebe eines 8-jährigen, afroamerikanischen Jungen mit hepatozellulärem Karzinom etabliert. Die Zelllinie besitzt ein integriertes Genom eines Hepatitis-B-Virus (www.DSMZ.de). Die Zelllinie wird somit in die Risikostufe 2 eingeteilt. Die epitheliale Zelllinie wächst als Monolayer.

Die Kultivierung der adhärent wachsenden Hep3B-Zellen erfolgte in 75 cm²-Zellkulturflaschen mit 15 ml RPMI 1640 und 10 % nicht hitzeinaktiviertem FCS. Die Zelllinie wurde alle zwei bis drei Tag im Verhältnis 1:3 bis 1:7 passagiert.

3.1.2 Kryokonservierung von Zellen

Eine Zelllinie verändert mit steigender Passage ihr Aussehen und ihr Expressionsverhalten. Daher ist es wichtig, Zellen einer möglichst niedrigen Passage einzufrieren, damit man bei späteren Untersuchungen auf diese zurückgreifen kann. Diesen Vorgang bezeichnet man als Kryokonservierung.

Die Zellen wurden in einer 75 cm²-Zellkulturflasche kultiviert. Das Medium wurde entfernt und die Zellen wurden mit 5 ml D-PBS gewaschen. Im Anschluss wurden 3 ml Trypsin-EDTA auf den Zellrasen pipettiert und die Flasche wurde je nach Zelllinie 2-3 min im Brutschrank bei 37°C bis zum Lösen der adhärenz gewachsenen Zellen vom Flaschenboden inkubiert. Die Zellen wurden in 10 ml Nährmedium resuspendiert und anschließend für 5 min bei 1000 U/ min und 21°C zentrifugiert. Das überstehende Medium wurde entfernt und das erhaltene Zellpellet wurde in einem Volumen von 3 ml mit 80 % Nährmedium (mit 10 % FCS), 10 % DMSO und 10 % FCS erneut resuspendiert. Je 1 ml dieser Zellsuspension wurde in Kryoröhrchen verteilt. Diese wurden zunächst eine Woche bei -80°C eingefroren und anschließend in flüssigen Stickstoff bei -196°C überführt, in dem die Zellen mehrere Jahre gelagert werden können.

3.1.3 Auftauen kryokonservierter Zellen

Die kryokonservierten Zellen wurden aus dem Stickstoffbehälter entnommen und rasch in handwarmem Wasser aufgetaut. Die Zellsuspension in den Kryoröhrchen wurde vorsichtig mit einer Pipette nochmals gemischt und tröpfchenweise in 6 ml Zellkulturmedium (plus 10 % FCS) in eine 25 cm²-Zellkulturflasche überführt. Am folgenden Tag wurden die Zellen mikroskopisch begutachtet. Je nach Wachstum wurden die Zellen 1-2 Tage nach dem Auftauen in eine 75 cm²-Zellkulturflasche passagiert.

3.1.4 Passagieren der Zellen

Die Zellen wurden alle 2-3 Tage mikroskopisch begutachtet und bei einer erreichten Konfluenz von 70-90 % passagiert. Hierfür wurde das verbrauchte Medium zunächst verworfen und die Zellen wurden mit 5 ml D-PBS gewaschen. Es wurden 3 ml Trypsin-EDTA auf den Zellrasen pipettiert und die Flasche wurde je nach Zelllinie 2-3 min im Brutschrank bei 37°C bis zum Lösen der adhärenz gewachsenen Zellen vom Boden inkubiert. Das Lösen der Zellen wurde zusätzlich durch leichtes Beklopfen der Zellkulturflasche unterstützt. Die Inaktivierung des Trypsins erfolgte durch Zugabe von 10 ml Zellkulturmedium. Die Zellen wurden in diesem resuspendiert und ein Teil der

Zellsuspension wurde, je nach angestrebtem Passagierverhältnis, in eine neue 75 cm²-Zellkulturflasche überführt und auf ein Gesamtvolumen von 15 ml mit Zellkulturmedium (plus 10 % FCS) aufgefüllt.

3.1.5 Zellzahlbestimmung

Um die Inkubationsversuche und Migrationsversuche durchzuführen und um gleiche Versuchsbedingungen beziehungsweise Ausgangszustände in den verschiedenen Ansätzen zu gewährleisten, musste jeweils eine definierte Anzahl an Zellen ausgesät werden. Dieses wurde durch die Zellzahlbestimmung ermöglicht. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde der Coulter[®] Z2 der Firma Beckman verwendet. Hierfür wurden die Zellen einer Zellkulturflasche abtrypsiniert, in 5 ml Medium resuspendiert und für 5 min bei 1000 U/min und 21°C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 3-4 ml Zellkulturmedium erneut resuspendiert. 50 µl der Zellsuspension wurden in 20 ml Isoton II in ein Coultergefäß pipettiert, gut vermischt und im Coulter[®] Z2 gemessen. Das errechnete Ergebnis entsprach der Zellzahl pro 1 ml.

3.2 Inkubationsversuche

Um die Wirkung von Effektoren auf die Zelllinien Sk-Hep1, HepG2 und Hep3B sowie mögliche Wechselwirkungen zwischen dem BMP-Signalweg und dem Thrombin-/PAR-Signalweg zu untersuchen, wurden Inkubationsversuche durchgeführt. Zum Nachweis der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wurden alle Versuche wiederholt. Die Arbeiten fanden unter der Sterilwerkbank statt.

3.2.1 Tag 1 – Aussäen der Zellen

Für die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ist es wichtig, dass gleiche Versuchsbedingungen beziehungsweise Ausgangszustände in den verschiedenen Ansätzen gewährleistet werden. Dafür wurden bei allen Versuchen je 1x10⁶ Zellen pro Versuchsansatz in 25 cm²-Zellkulturflaschen ausgesät. Nach Bestimmung der Zellzahl einer Zellsuspension im Coulter[®] Z2 wurde die entsprechende Menge der Suspension in die Zellkulturflaschen vorgelegt und mit dem Medium (plus 10 % FCS) auf ein Gesamtvolumen von 6 ml aufgefüllt.

3.2.2 Tag 2 – Zellen serumfrei machen

Nach 24h wurde das alte Zellkulturmedium abgenommen und die Zellen wurden drei Mal mit 3 ml D-PBS gewaschen. Nach Zugabe von 6 ml Medium (DMEM oder RPMI 1640) ohne

FCS auf jede einzelne Flasche kamen sie für weitere 24h in den Brutschrank. Durch den Entzug des FCS erreicht man künstlich eine Art Hungerzustand der Zellen.

3.2.3 Tag 3 und 4 – Inkubation der Zellen

Die Inkubationsversuche selber erfolgten unter serumfreien Bedingungen. Das Zellkulturmedium wurde nach 24h Serumfreiheit abgenommen und die Zellen wurden ein weiteres Mal mit 3 ml D-PBS gewaschen. Das Inkubationsvolumen betrug pro Zellkulturflasche 2 ml. Hierfür wurde Medium mit den in **Tab. 7** aufgelisteten Substanzen mit unterschiedlichen Konzentrationen versetzt.

Tab. 7 Für die Inkubation eingesetzte Substanzen und deren Konzentrationen

Substanz	Endkonzentration	Stammlösung
PAR ₁ -Agonist	100 µM	10 mM
PAR ₂ -Agonist	10 µM	10 mM
PAR ₄ -Agonist	400 µM	10 mM
rhBMP-2	10 ng/ml	100 µg/ml
	50 ng/ml	
	100 ng/ml	
Thrombin	0,1 U/ml	10 U/µl
	0,01 U/ml	
	0,01 U/ml	
Dorsomorphin	2 µM	1 mM
	5 µM	
	10 µM	

Die Zellkulturflaschen wurden in den Brutschrank gelegt und pro Versuchsansatz für jeweils 4h und 24h inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeiten erfolgte die RNA-Isolation bzw. die Proteinisolierung.

3.3 Isolierung der Gesamt-RNA

Am Ende der jeweiligen Inkubationszeiten wurde aus den Zelllinien die Gesamt-RNA, ein Gemisch bestehend aus rRNA, tRNA und mRNA, isoliert. Hiefür wurden die Zellen zunächst lysiert, die RNasen inaktiviert und schließlich wurde die Gesamt-RNA gewonnen. Die für weitere Untersuchungen wichtige mRNA macht dabei nur einen geringen Anteil von etwa 2 % aus. Die Menge war jedoch für weitere Anwendungen, beispielsweise die RT-PCR, ausreichend. Die Isolierung der RNA wurde bei Raumtemperatur und nach zwei verschiedenen Protokollen durchgeführt.

Die RNA-Isolation erfolgte sowohl mit dem RNeasy[®] Mini Kit von QIAGEN als auch nach dem Protokoll des innuPREP Mini Kits von AnalytikJena. Hauptsächlich wurde die totale RNA nach dem Protokoll des letzteren Kits nach folgendem Schema isoliert:

Das Medium wurde verworfen und die Zellen wurden ein Mal mit D-PBS gewaschen. Nun wurden 450 µl Lysepuffer RL auf den Zellrasen einer Zellkulturflasche pipettiert. Das durch die Zelllyse entstandene visköse Gemisch, das noch hochmolekulare genomische DNA enthält, wurde mit einem Zellschaber vom Boden der Zellkulturflasche geschabt, mit einer Pipette homogenisiert und auf einen blauen Spin Filter R gegeben und für 2 min bei 12000 U/min zentrifugiert. Zelltrümmer des Zelllysats wurden im Filter zurückgehalten. Der Filter wurde verworfen und dem Zentrifugat wurden 400 µl Ethanol (70 %-ig) zugesetzt und gut gemischt, bis keine Schlieren mehr sichtbar waren und eine homogene Flüssigkeit entstand. Die Lösung wurde anschließend in einen rosa Spin Filter R überführt und für 2 min bei 12000 U/min zentrifugiert. In diesem Spin Filter R, in dem Silicagel enthalten ist, wurde die RNA gebunden. Der Filter wurde nun auf ein neues Reaktionsgefäß gesetzt und die RNA wurde durch die anschließenden Waschschrte gereinigt und Kontaminationen wurden entfernt. Zunächst wurden 500 µl Waschlösung HS auf die Membran gegeben und für 1 min bei 12000 U/min abzentrifugiert. Danach wurde ein weiteres Mal mit 700 µl Waschlösung LS gewaschen und erneut für 1 min bei 12000 U/min zentrifugiert. Es folgte eine abschließende Zentrifugation für 2 min bei 12000 U/min. Die RNA wurde nun mit 50-60 µl RNase-freiem Wasser (1x30 µl und 1x20 oder 30 µl) nach einminütiger Inkubation und zweimaliger Zentrifugation für je 1 min bei 8000 U/min in ein Reaktionsgefäß eluiert. Die so gewonnene RNA wurde auf Eis gestellt und weiterverarbeitet oder bei -80°C gelagert.

3.4 RNA-Konzentrationsbestimmung

Da gewährleistet werden muss, dass bei der cDNA-Synthese die gleiche Menge an RNA eingesetzt wird, ist die Bestimmung der RNA-Konzentration von großer Bedeutung. Dies erfolgte photometrisch am NanoDrop 1000. Hierbei handelt es sich um ein Spektralphotometer, das bei drei Wellenlängen (230, 260 und 280 nm) die jeweiligen Absorptionen misst. Das Absorptionsmaximum der RNA liegt bei 260 nm. Das der Proteine liegt auf Grund der Absorption der aromatischen Aminosäuren hingegen bei 280 nm. Als Ausdruck der Reinheit der gewonnenen RNA dient der Quotient 260/280, der ungefähr bei 2,0 liegen sollte.

Zur Eichung des Gerätes wurde zunächst 1 µl Ampuwa[®]-Wasser auf den Messpunkt pipettiert und gemessen. Anschließend erfolgte die Messung der RNA-Proben. Das Ergebnis der

jeweiligen RNA-Konzentration, das auf der Absorption bei 260 nm basiert, wurde in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ angegeben.

3.5 cDNA-Synthese

Bei der cDNA handelt es sich um komplementäre DNA (complementary DNA). Zu ihrer Synthese wird mit Hilfe des Enzyms „reverse Transkriptase“ zu RNA, die als Matrize dient, ein komplementärer DNA-Strang nach dem Prinzip der Basenpaarung synthetisiert. Als reverse Transkriptase wurde M-MLV (moloney murine leukemia virus) reverse Transkriptase eingesetzt. Es wurde ein Oligo-(dT)-Primer eingesetzt. Dieser lagert sich an den terminalen Poly-A-Schwanz von eukaryotischer mRNA an. Von dem Primer ausgehend wird dann die cDNA enzymatisch synthetisiert. Zusätzlich wurden Random-Hexamerprimer verwendet. Hierbei handelt es sich um ein Gemisch von Hexanukleotiden, die alle möglichen Sequenzen für ein Hexamer repräsentieren und somit an den verschiedensten Stellen komplementärer RNA-Sequenzen binden können. Statistisch gesehen werden somit alle Bereiche der mRNA in cDNA umgewandelt. Ebenso kamen dNTPs, Desoxynukleosidtriphosphate, und RNase OUT, ein Inhibitor von RNasen, zum Einsatz.

Bei der cDNA-Synthese wurde 1 μg der gewonnenen Gesamt-RNA eingesetzt und die errechnete Menge wurde mit Ampuwa[®]-Wasser auf ein Gesamtvolumen von 8,5 μl aufgefüllt. Dieses Gemisch wurde für 5 min auf 65°C erhitzt. In der Zwischenzeit wurde der Reaktionsmix vorbereitet.

Dieser enthielt pro Ansatz:

- 4 μl 5x First Strand Buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8,3; 375 mM KCl; 15 mM MgCl_2 , Invitrogen)
- 2 μl Dithiothreitol (DTT) (0,1 mM, Invitrogen)
- 1 μl Oligo-(dT)-Primer (0,2 mg/ml)
- 1 μl Random-Hexamerprimer (0,2 mg/ml)
- 2 μl dNTP-Mix (je 2,5 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- 0,5 μl RNase OUT[™]-Ribonuklease (40 U/ μl)
- 1 μl M-MLV Reverse Transkriptase (200 U/ μl)

Jeweils 11,5 μl des Reaktionsmixes wurden nun zu der RNA pipettiert und zunächst für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit konnten sich die Primer an die RNA anlagern. Anschließend folgte eine 60-minütige Inkubation bei 37°C im Brutschrank. Bei dieser Temperatur, bei der die reverse Transkriptase ihre größte Aktivität besitzt, fand die

Transkription statt. Nach 60 Minuten wurden die Ansätze für 8 min bei 95°C erhitzt, wodurch die reverse Transkriptase inaktiviert wurde.

Die so synthetisierte cDNA wurde bei -20°C gelagert oder direkt für eine Polymerasekettenreaktion (PCR) verwendet.

3.6 RT-PCR

Die Polymerasekettenreaktion (engl. PCR, polymerase chain reaction) führt zur Vervielfältigung (Amplifikation) von Nukleotidsequenzen. Hierbei dient die durch die Umschreibung (reverse Transkription) von mRNA gewonnene cDNA als Vorlage (Template). Da bei der PCR durch reverse Transkription (RT) die cDNA amplifiziert wird, wird diese auch als RT-PCR bezeichnet. Bei der Methode kommen spezifische Primer zum Einsatz, die sich zu beiden Seiten des zu amplifizierenden Genabschnittes anlagern. Die Vervielfältigung des Genabschnittes wird durch die thermostabile Taq-Polymerase ermöglicht. Die PCR erfolgt zyklisch nach folgendem Schema:

Initial wurden alle Proben für 5 min auf 95°C erhitzt, um den DNA-Doppelstrang zu denaturieren und die komplexen DNA-Strukturen aufzulösen. Anschließend folgt ein Zyklus aus drei Schritten: Denaturierung, Annealing und Elongation. Die Ansätze wurden in jedem Zyklus zur Denaturierung für 30s auf 95°C erhitzt. Im Anschluss wurden die Ansätze auf die Annealing-Temperatur abgekühlt. Bei dieser Temperatur, die Primer-spezifisch ist, kommt es zur Hybridisierung der Primer an die komplementären DNA-Abschnitte auf dem Template. Im dritten Schritt kommt es zur Erwärmung des Ansatzes auf 72°C. Durch die Taq-Polymerase, die bei dieser Temperatur ihr Aktivitätsoptimum aufweist, erfolgt die Verlängerung, Elongation, der Primer. Dieser Zyklus wurde je nach Gen 28-34 Mal durchlaufen. Abschließend erfolgte eine terminale Elongation für 5 min bei 74°C. Diese Phase dient der vollständigen Verlängerung der synthetisierten Stränge. Die Primer-spezifischen PCR-Programme sind in **Tab. 8** dargestellt. Die Primersequenzen im Materialenteil aufgelistet.

Tab. 8 PCR-Programme

Primer	Denaturierung	Annealing	Elongation	Zyklenanzahl
β-Aktin	95°C/30s	60,5°C/30s	72°C/20s	28
BMP-2	95°C/30s	60°C/30s	72°C/30s	34
BMP-3	95°C/30s	64°C/30s	72°C/30s	34
BMP-5	95°C/30s	56°C/30s	72°C/30s	34
BMP-6	95°C/30s	65,5°C/30s	72°C/30s	34
BMP-7	95°C/30s	65°C/30s	72°C/30s	34
BMPR-IA	95°C/30s	58°C/30s	72°C/25s	34

Primer	Denaturierung	Annealing	Elongation	Zyklenanzahl
BMPR-IB	95°C/30s	55°C/20s	72°C/30s	32
BMPR-II	95°C/30s	60°C/30s	72°C/45s	34
AktR-IA	95°C/30s	67°C/30s	72°C/30s	34
AktR-IB	95°C/30s	67°C/30s	72°C/30s	34
AktR-IIA	95°C/30s	67°C/30s	72°C/30s	34
AktR-IIB	95°C/30s	67°C/30s	72°C/30s	34
Gremlin	95°C/30s	60°C/30s	72°C/30s	50
Dan	95°C/30s	60°C/30s	72°C/30s	23
Chordin	95°C/30s	60°C/30s	72°C/30s	34
Noggin	95°C/40s	62°C/40s	72°C/50s	34

Der Ansatz für jede Probe mit einem Gesamtvolumen von 25 µl enthält:

- 1 µl cDNA
- 18,3 µl Ampuwa®-Wasser
- 2,5 µl 10x PCR-Puffer
- 1,0 µl Primer-Gemisch (je 10 µM sense- und antisense-Primer)
- 2,0 µl dNTP-Mix (je 2,5 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- 0,2 µl Taq-Polymerase (Endkonzentration 1 U)

Zunächst wurde der Reaktionsmix ohne die Taq-Polymerase angesetzt. 1 µl der cDNA jeder Probe wurde in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt und mit 24 µl des Reaktionsmixes, nachdem die Taq-Polymerase hinzugegeben wurden, vermischt, kurz zentrifugiert und in den TRIO-Thermozykler gegeben. Als Negativkontrolle wurde stets ein Ansatz mit Ampuwa®-Wasser statt cDNA mitgeführt.

3.7 Auftrennung der PCR-Produkte durch Agarosegelelektrophorese

Die PCR-Produkte wurden im nächsten Schritt durch eine Agarosegelelektrophorese entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Hierfür wurden 1%ige Agarosegele verwendet. Agarose, ein Polysaccharid, ist ein starker Gelbildner. Diese wurde in 1x TAE-Puffer (siehe Materialien) in der Mikrowelle aufgeköcht, bis eine klare Flüssigkeit entstand und keine Schlieren mehr sichtbar waren. Nach Abkühlen der Agaroselösung auf etwa 60°C wurde diese mit Ethidiumbromid (2,0 µl/100 ml) versetzt, in ein Trägertablett, das mit einem Kamm für die Taschenbildung versehen war, gegossen und etwa 45 min bis zum Polymerisieren bei Raumtemperatur stehen gelassen. Ethidiumbromid ist ein organischer Farbstoff und wird zum Nachweis von Nukleinsäuren genutzt. Einzelne Ethidiumbromidmoleküle sind planar und interkalieren zwischen die Basen der DNA. Nach Anregung der Substanz mit UV-Licht kommt es zur Emission eines Fluoreszenzsignals, das detektiert werden kann. Auf diese

Weise können die Ethidiumbromid-gefärbten Banden bzw. PCR-Produkte im Gel visualisiert und ausgewertet werden. Die Stärke des Fluoreszenzsignals korreliert hierbei mit der vorliegenden Konzentration der PCR-Produkte.

Die Gelelektrophoresekammer von Biometra wurde mit 1x TAE-Puffer befüllt. Das polymerisierte Gel wurde mit Trägertablett in der Apparatur platziert und der Kamm vorsichtig entfernt. Anschließend wurden 15 µl der PCR-Produkte mit 5 µl DNA-Ladungspuffer (siehe Materialien) vermischt und auf das Gel in die Taschen aufgetragen. Für die spätere Größenzuordnung bzw. Bestimmung des Molekulargewichts der Banden wurden zusätzlich 15 µl eines 1 kb DNA-Längenstandards, vermischt mit 5 µl DNA-Ladungspuffer, aufgetragen. Der Gellauf erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 200 mA, bis der Farbstoff Bromphenolblau, der im DNA-Ladungspuffer enthalten war und als Laufmarker diente, etwa die Hälfte des Gels erreicht hatte. Die Auswertung und Visualisierung der Ethidiumbromid-gefärbten Banden der PCR-Produkte erfolgte mit Hilfe eines Videokamera-basierten Computersystems von Intas.

3.8 Realtime-PCR

Die realtime-PCR unterscheidet sich nicht wesentlich von der herkömmlichen RT-PCR. Als Vorteil bietet sie die Möglichkeit der Quantifizierung der amplifizierten PCR-Produkte. Dies wird durch den Fluoreszenzfarbstoff SYBR[®] Green ermöglicht. Der Farbstoff interkaliert sequenzunspezifisch in die doppelsträngige DNA. SYBR[®] Green fluoresziert gering, während es sich in Lösung befindet. Bindet der Farbstoff jedoch an die DNA, nimmt das Fluoreszenzsignal stark zu. Somit korreliert die Fluoreszenz des Farbstoffes exponentiell mit der amplifizierten PCR-Menge. Auf diese Weise ist eine Quantifizierung der PCR-Produkte während des PCR-Zyklus, also in „realtime“, möglich. Bei der konventionellen PCR handelt es sich hingegen nur um eine Endpunktbestimmung. Am Ende des Amplifikationsprogramms erfolgt eine Schmelzkurvenanalyse, die der Identifizierung der Produkte dient. Ein eindeutiger Peak der Schmelzkurve gibt hierbei einen Hinweis auf die Qualität des PCR-Produktes. Die realtime-PCRs wurden sowohl im LightCycler[®] von Roche als auch im Mastercycler[®] ep realplex von Eppendorf durchgeführt.

Vorgehen am LightCycler[®]:

Alle Arbeiten fanden im Kühlblock bei 4°C statt. Es wurde das Kit LightCycler[®] FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green I von Roche-Diagnostics verwendet. Zunächst wurde der Mastermix hergestellt. Hierfür wurden 14 µl von dem Enzym Ia (Taq-Polymerase) in 1b (Reaktionsmix) gegeben. Anschließend wurde 1 µl cDNA (bzw. Wasser oder β -Aktin-

Kontrollfragmente) pro Glaskapillare vorgelegt. Zu dieser wurden 19 µl der Arbeitslösung, bestehend aus 14 µl H₂O, 1 µl Primer und 4 µl Mastermix, zugegeben. Die Kapillaren wurden in einem entsprechenden Adapter kurz zentrifugiert, mit einem Deckel versehen und im Karussell des LightCycler® platziert. Abschließend wurde das „Standard“-Programm, welches in **Tab. 9** dargestellt ist, gestartet. Die Auswertung fand mit der dazugehörigen Software statt. Folgende Primer wurden mit dem „Standardprogramm Aktin“ untersucht: BMP-2, BMP-3, BMP-5, BMP-6, BMP-7, BMPR-IA, BMPR-IB, BMPR-II, AktR-IA, AktR-IB, AktR-IIA, AktR-IIB, Gremlin, Dan, Chordin, Noggin, ID-1 und ID-2.

Tab. 9 Standardprogramm am LightCycler®

Programm	Denaturierung	Annealing	Elongation	Zyklusanzahl
Standard	95°C/15 s	59°C/10 s	72°C/17 s	50

Vorgehen am Mastercycler® ep realplex:

Als Kit wurde LightCycler® 480 SYBR Green I Master von Roche-Diagnostics verwendet.

Auch an diesem Gerät fanden alle Arbeiten im Kühlblock bei 4°C statt. Bei diesem System wurde mit 96-well-Platten gearbeitet, die im Kühlblock platziert wurden. Wie beim LightCycler wurde jeweils 1 µl der zu untersuchenden cDNA (bzw. Wasser oder β-Aktin-Kontrollfragmente) pro Well vorgelegt. Zu dieser wurden 19 µl der vorbereiteten Arbeitslösung, bestehend aus 14 µl Wasser, 1 µl Primer und 14 µl Mastermix, im Dunkeln pipettiert. Die Platte wurde mit CapStrips oder mit einer Versiegelungsfolie verschlossen, kurz gemischt und zentrifugiert und in der Apparatur platziert. Die Auswertung fand mit der dazugehörigen Software statt.

Zusätzlich zu den oben aufgelisteten Primern wurden am Mastercycler® ep realplex die Primer VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) und Met untersucht. Als PCR-Programm wurde das in **Tab. 10** dargestellte „Standard“-Programm gewählt. Ausnahmen sind BMP-6, Noggin und ID-1. Deren Programme, siehe **Tab. 10**, wurden hinsichtlich der Annealing-Temperatur oder der Elongationszeit optimiert.

Tab. 10 Programme am Mastercycler® ep realplex

Programm	Denaturierung	Annealing	Elongation	Zyklusanzahl
„Standard“	95°C/10 s	52°C/15 s	72°C/25 s	40
BMP-6	95°C/10 s	53°C/15 s	72°C/22 s	40
Noggin	95°C/10 s	53°C/15 s	72°C/24 s	40
ID-1	95°C/10 s	64°C/15 s	72°C/25 s	40

Durch die zusätzliche Bestimmung von β -Aktin-Kontrollfragmenten, die in unserem Labor hergestellt wurden und deren Konzentration bekannt ist, konnte eine Standardkurve ermittelt werden. Anhand dieser wurden die untersuchten Proben quantifiziert. Als Housekeeping-Gen diente β -Aktin. Auf dieses wurden die jeweiligen Amplifikatmengen der inkubierten Ansätze abgeglichen und schließlich auf die Kontrolle, serumfreies Medium, bezogen.

3.9 Migrationsversuche

Mittels Migrationsversuchen wird die Wanderungsfähigkeit von Tumorzellen analysiert. Diese Fähigkeit ist eine wichtige Voraussetzung für die Absiedlung von Metastasen. Die Migration beschreibt hierbei die zielgerichtete Zellbewegung entlang eines Konzentrationsgradienten eines chemischen Signals, auch Chemotaxis genannt. Es wurde der Einfluss von verschiedenen chemoattraktiven und möglichen migrationsinhibierenden Substanzen untersucht.

3.9.1 Vorbereitung

Für die Migrationsversuche wurden Hep3B-Zellen kultiviert, bis sie in 25 cm²-Zellkulturflaschen einen konfluenten Zellrasen ausbildeten.

24h vor dem Migrationsversuch wurde das alte Zellkulturmedium abgenommen und die Zellen wurden drei Mal mit 3 ml D-PBS gewaschen. Nach Zugabe von 6 ml Medium (RPMI 1640 ohne FCS) auf die Flasche wurden sie für weitere 24h im Brutschrank bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Durch den Entzug des FCS erreicht man künstlich eine Art Hungerzustand der Zellen.

Ebenso wurde 24 h vor dem Versuch eine Polycarbonatmembran mit einer Porengröße von 8 μ m, die als Filter für die migrierenden Zellen dient, mit Kollagen beschichtet. Hierfür wurde eine 20 % ige Kollagenlösung, D-PBS plus Kollagenansatz (siehe Materialien), angesetzt. Die Membran wurde in die Kollagenlösung gelegt, bis sie vollständig benetzt war, und über Nacht im Kühlschrank gelagert.

3.9.2 Ansatz des Migrationsversuches

In Vorbereitung des Versuches wurde die über Nacht in Kollagen gelagerte Membran 3 Mal mit D-PBS gewaschen und luftgetrocknet. Ebenso wurden die Lösungen für den Versuch in Falconröhrchen angesetzt.

Für die Herstellung der Zellsuspension wurde nach 24h Serumfreiheit das alte Medium aus den Zellkulturflaschen abgenommen und die Zellen einmal mit 3 ml D-PBS gewaschen. Es wurden 3 ml Trypsin-EDTA auf den Zellrasen pipettiert und die Flasche wurde 2-3 min im

Brutschrank bei 37°C bis zum Lösen der adhärent gewachsenen Zellen vom Boden inkubiert. Das Lösen der Zellen wurde zusätzlich durch leichtes Beklopfen der Zellkulturflasche unterstützt. Die Zellkulturflasche wurde mit 3 ml D-PBS gespült und die Zellsuspension in ein Falconröhrchen überführt. Es folgte eine Zentrifugation für 5 min bei 9000 U/min und 21°C. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen wurden in 4 ml serumfreien Medium resuspendiert. Je nach Versuchsansatz wurde ein Teil der Zellsuspension auf weitere Falconröhrchen verteilt und mit möglichen, zu untersuchenden Inhibitoren der Zellmigration versehen.

Die Migration-Assays wurden mittels einer 48-Well Boyden Chamber von NeuroProbe durchgeführt. 27 µl des Zellkulturmediums, das je nach Versuchsansatz entweder keine Zusätze oder chemoattraktive Substanzen beinhaltete, wurden in die Wells des unteren Kompartiments pipettiert. Anschließend wurden die luftgetrocknete, Kollagen-beschichtete Polycarbonatmembran und eine mit Wells versehene Gummimatte luftblasenfrei darauf gelegt. Es folgte die Befüllung der Wells des oberen Kompartiments mit jeweils 51 µl (etwa 3×10^4 Zellen pro Well) der vorbereiteten Zellsuspension, die je nach Versuchsansatz migrationsmodifizierende Zusätze enthielt.

Die Boyden Chamber wurde zugeschraubt und es folgte eine Inkubationszeit von 24h im Brutschrank bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit. In dieser Zeit hatten die Zellen die Möglichkeit, durch die Poren der beschichteten Membran zu migrieren.

3.9.3 Färbung der Polycarbonatmembran und Auswertung

Nach der Inkubationszeit wurde die Membran aus der Boyden Chamber entnommen. Die obere Seite wurde vorsichtig mit einem Wattestäbchen gereinigt, um nicht migrierte Zellen zu entfernen. Die migrierten Zellen blieben an der Unterseite der Membran haften. Diese wurden für drei Minuten in 96 %igem Ethanol fixiert. Die Membran wurde danach drei Mal in Aqua dest. gewaschen. Die Zellen wurden im Anschluss für drei Minuten in einer filtrierten GiemsaLösung (siehe Materialien) gefärbt. Abschließend wurde die Membran nochmals drei Mal in Aqua dest. gewaschen und zum Trocknen auf einen Objektträger aufgebracht.

Die Auswertung der Migrationsversuche erfolgte mikroskopisch am Zeiss Axiolab mit 40-facher Vergrößerung. Hierfür wurden rasterhaft alle migrierten Zellen jedes Wells gezählt und der Mittelwert aus gleichen Versuchsansätzen ermittelt.

3.10 Western Blot

Der Western Blot ist eine Methode, die der Charakterisierung von Proteinen dient. Hierfür wird das Proteingemisch zunächst elektrophoretisch nach dem Molekulargewicht in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Anschließend findet der eigentliche Blot statt und die Proteine werden durch ein senkrecht zum Gel angelegtes, elektrisches Feld auf eine PVDF-Membran (Polyvinylidenfluorid-Membran) übertragen, auf der sie immobilisiert werden. Der Nachweis der Proteine erfolgt dann indirekt durch spezifische Antikörper.

3.10.1 Proteinisolierung

Nach Inkubation der Zellen mit entsprechenden Substanzen erfolgte die Proteinisolierung. Zur Gewinnung der Proteine wurde zunächst das Medium aus den 25 cm²-Zellkulturflaschen abgekippt und die Zellen wurden drei Mal mit eiskaltem D-PBS gewaschen. Restliches D-PBS wurde gründlich entfernt und die Zellkulturflaschen wurden auf Eis gestellt.

Nun wurden zum Ablösen der Zellen 200 µl des vorbereiteten, kalten Proteinlysepuffers (siehe Materialien) auf den Zellrasen pipettiert und die Flasche anschließend auf Eis gelegt. Nach einer kurzen Inkubationszeit wurde der Zellrasen mit einem Zellschaber vom Boden der Zellkulturflaschen gekratzt. Das Zelllysate wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und über Nacht bei -80 °C eingefroren. Am folgenden Tag wurde das Zelllysate nach dem Auftauen für 15 min bei 4°C und 14.000 U/min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde verworfen und der Überstand, in dem sich die Proteine befanden, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Alle weiteren Schritte fanden stets auf Eis statt.

3.10.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration fand photometrisch mittels der Bradford-Methode statt. Das Prinzip der Messung beruht auf der Änderung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes Coomassie-Brillant-Blau. Dieses nimmt in Abhängigkeit von der in der Lösung vorhandenen Proteinmenge zu. Durch die Komplexbildung mit Proteinen verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 465 nm auf 595 nm.

Die optische Dichte (OD) der Proteinlösung wurde am Spektro-Photometer Ultrospec III der Firma Pharmacia bestimmt. Als Referenz und zur Eichung des Gerätes wurden zunächst 500 µl Aqua dest. und 500 µl Bradford-Reagenz in einer Plastikkuvette vermischt und für 5 min im Dunkeln inkubiert. In der Zwischenzeit wurde das Photometer auf die Wellenlänge 595 nm eingestellt und anschließend das Gerät durch die Leermessung geeicht.

Zur Bestimmung der optischen Dichte der Proteinlösung wurden nun 2 µl der zu untersuchenden Probe in 498 µl Aqua dest. in einer Plastikkuvette vorgelegt, mit 500 µl Bradford-Reagenz vermischt und für 5 min im Dunkeln inkubiert. Am Spektro-Photometer wurde die optische Dichte der Proteinlösung angezeigt.

Die Proteinkonzentration C jeder einzelnen Probe wurde dann nach der folgenden, in unserem Labor entwickelten Formel berechnet:

$$C \text{ [mg/ml]} = 10 * (0,8548 * OD^2 + 0,4474 * OD)$$

3.10.3 Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE

Die Proteine wurden durch eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese in Gegenwart von Natrium (engl. Sodium)- Dodecylsulfat (SDS) nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. SDS-beladene Proteine weisen ein nahezu identisches Ladungs-Masse-Verhältnis auf. SDS ist negativ geladen und führt zu einer Maskierung der Eigenladung der Proteine, wodurch alle Proteine stark negativ geladen sind und im elektrischen Feld zur Anode wandern. Des Weiteren führt SDS zur Denaturierung der Proteine. Durch die zusätzliche Zugabe von β-Mercaptoethanol werden Disulfidbrücken gespalten, so dass Proteinuntereinheiten als einzelne Banden in der SDS-PAGE laufen.

In den Versuchen wurden jeweils 50 µg Protein/ml eingesetzt. Das entsprechende Volumen V der Proben wurde nach folgender Formel berechnet:

$$V \text{ [µl]} = m \text{ [mg]} * 1000 / C \text{ [mg/ml]}$$

$$m = \text{Masse [mg, µg]}$$

$$V \text{ [µl]} = 0,050 \text{ mg} * 1000 / C \text{ [mg/ml]}$$

$$V = \text{Volumen [ml, µl]}$$

$$C = \text{Konzentration [mg/ml]}$$

Pro Probe wurde ein maximales Volumen von 30 µl eingesetzt und bei Bedarf mit Proteinlysepuffer auf ein einheitliches Volumen aufgefüllt. Anschließend wurden die Proben mit 4fach XT-Probenpuffer und 20fach Reducing-Agent versetzt, gut gemischt und kurz zentrifugiert. Der gesamte Ansatz wurde für 5 min bei 95°C im Thermoschüttler gekocht, wodurch Tertiär- und Sekundärstrukturen der Proteine aufgelöst wurden. Danach wurden die Proben nochmals gemischt und zentrifugiert. Für die elektrophoretische Auftrennung wurde ein fertiges 10%iges Polyacrylamidgel der Firma Bio-Rad verwendet. Das Fertiggel wurde in eine Gelkammer derselben Firma gesteckt und die Gelkammer wurde mit 500 ml Laufpuffer (siehe Materialien) befüllt. Anschließend wurde das Gel mit den Proteinproben beladen. Zur späteren Größenzuordnung der Proteinbanden wurden zusätzlich 12 µl des Cruz Marker™ und 10 µl des Precision Plus Protein™ Kaleidoscope Standards aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte konstant bei 145 V und 0,3 A für 75 min.

3.10.4 Das Blotten

Beim Blotten werden elektrophoretisch aufgetrennte Proteine von einem Gel auf eine stabile Membran übertragen. Auf dieser liegen sie anschließend in immobilisierter Form vor und sind weiteren Untersuchungen wie Enzymreaktionen zugänglich.

Nach Beenden der SDS-Page wurde die Gelkammer vorsichtig aufgebrochen und das Gel für 20 min in Transferpuffer (siehe Materialien) gelegt und geschüttelt. In der Zwischenzeit wurde eine PVDF-Membran auf die Gelgröße zugeschnitten, 1 min in 100 % Methanol equilibriert und danach für mindestens 5 min in Transferpuffer inkubiert. Des Weiteren wurden 4 Filterpapiere in Transferpuffer eingeweicht. Es erfolgte die Schichtung der Filterpapiere, des Gels und der Membran nach dem in **Abb. 5** dargestelltem Schema in der Blotapparatur.

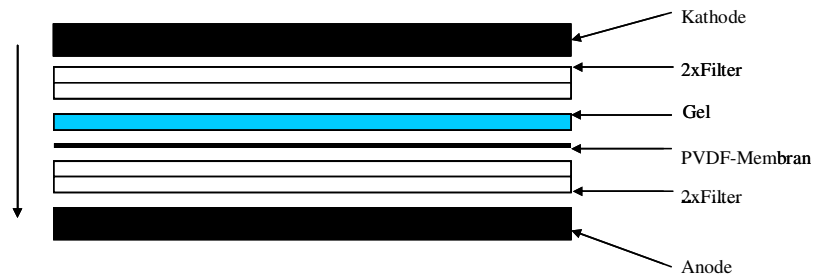


Abb. 5 Western Blot Sandwich

Anschließend erfolgte der Proteintransfer in einem semi-dry Blotverfahren elektrisch auf eine PVDF-Membran bei konstanten 0,09 A und 25 V für 90 min.

3.10.5 Inkubation mit Antikörpern und Detektion der Proteine

Direkt nach dem Blot wurde die PVDF-Membran aus der Apparatur entnommen, mit Aqua dest. abgespült und für 1 h bei Raumtemperatur in 25 ml 4%iger BSA-Lösung (siehe Materialien) geblockt. Durch den Blockingpuffer werden freie Bindungsstellen der Membran mit unspezifischen Proteinen abgesättigt. Danach wurde die Membran drei Mal für jeweils 10 min in TBS-T-Waschpuffer auf dem Schüttler gewaschen und im Anschluss mit dem primären Antikörper (siehe **Tab. 11**) bei 4°C über Nacht auf einem Schüttler inkubiert. Der primäre Antikörper bindet sich spezifisch an die Proteine auf der Membran. Am nächsten Tag wurde die Membran erneut drei Mal für jeweils 10 min in TBS-T-Waschpuffer gewaschen und dann mit dem sekundären Antikörper (siehe **Tab. 11**) für 1 h bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Der sekundäre, mit einer Peroxidase-gekoppelte Antikörper bindet

an den Fc-Teil des primären Antikörpers und macht durch eine spätere Enzymreaktion einen indirekten Nachweis der auf der Membran fixierten Proteine möglich.

Tab. 11 Eingesetzte primäre und sekundäre Antikörper (verdünnt in 4% BSA-Lösung)

Protein	Primärer Antikörper	Verdünnung	Sekundärer Antikörper	Verdünnung
Smad 1/5/8	Smad 1/5/8	1:1000	goat anti-rabbit	1:2000
	pSmad 1/5/8	1:500	goat anti-rabbit	1:2000
p44/42 MAPK	p44/42 MAPK	1:1000	goat anti-rabbit	1:2000
	pp44/42 MAPK	1:1000	goat anti-mouse	1:2000
Akt	Akt	1:1000	goat anti-rabbit	1:2000
	pAkt	1:1000	goat anti-rabbit	1:2000
p38	p38 MAPK	1:500	goat anti-rabbit	1:2000
	pp38 MAPK	1:500	goat anti-rabbit	1:2000
Met	Met	1:1000	goat anti-rabbit	1:2000
	pMet	1:1000	goat anti-rabbit	1:2000

Nach der einstündigen Inkubation wurde die Membran nochmals drei Mal für jeweils 10 min in TBS-T-Waschpuffer gewaschen.

Zur Detektion des Peroxidase-gekoppelten Antikörpers wurde die ECL-Methode (enhanced chemoluminescence) angewandt. Das Prinzip besteht darin, dass die Peroxidase Luminol zu einem Radikal oxidiert. Dieses wiederum emittiert Licht, das detektiert werden kann. Hierfür wurde die Membran nach kurzem Abtropfen des Waschpuffers für 1 min in der ECL-Lösung (jeweils 3,0 ml von Reagenz 1 und 2) im Dunkeln inkubiert und nach kurzem Abtropfen der ECL-Lösung zwischen zwei Folien eines Spezial-Vernichtungsbeutels gelegt. Mögliche Luftblasen wurden ausgestrichen. Die Auswertung erfolgte am LAS-3000 (Luminescent Image Analysis System). Die Membran wurde in das Gerät gelegt und die Chemilumineszenz gemessen, bis eindeutige Banden sichtbar waren. Die Intensität der Banden korrelierte hierbei mit der aufgetragenen Proteinmenge.

3.10.6 Rehybridisierung der Membran

Für jedes Protein wurde zunächst die phosphorylierte, aktivierte Form untersucht. Um den Unterschied zur nicht phosphorylierten Form zu bestimmen, wurde im Anschluss auch der Gesamtgehalt am jeweiligen Protein untersucht. Hierfür musste die Membran rehybridisiert bzw. gestrippt werden. Hierbei wird der Antikörperkomplex entfernt und die Untersuchung mit einem weiteren Antikörper ermöglicht. Dafür wurde die Membran in einer Schale in einem Wasserbad für 15 min bei 50°C im Stripping-Puffer (siehe Materialien) inkubiert. Anschließend wurde die Membran zwei Mal 5 min und ein Mal 10 min in TBS-T-Waschpuffer gewaschen, bis kein β -Mercaptoethanolgeruch mehr vorhanden war. Danach

konnte die Membran erneut mit Blockingpuffer abgesättigt werden und der Vorgang wurde wie unter 3.10.5 beschrieben wiederholt.

3.10.7 Auswertung

Die Bilder der Proteinbanden wurden mit dem Programm AIDA Image Analyser 3.52 ausgewertet. Es wurde der Quotient aus der Menge an phosphoryliertem Protein und Gesamtprotein gebildet. Schließlich wurden die Werte zur versuchsinternen Kontrolle, serumfreies Medium plus 1% DMSO, bezogen.

3.11 Statistische Auswertung

Die Unterschiede der Migrationsversuche wurden mit SPSS 15.0 für Windows untersucht. Da bei den Daten keine Normalverteilung vorliegt, wurde zur statistischen Auswertung der nicht parametrische Mann-Whitney-Test verwendet, bei dem zwei unabhängige Stichproben miteinander verglichen werden. Als signifikant wurde ein p-Wert von $< 0,05$ angesehen.

4 Ergebnisse

4.1 Bestimmung des Expressionsmusters von Mitgliedern des BMP-Netzwerkes in etablierten Zelllinien des HCCs

Zur Expression und tumorbiologischen Bedeutung der BMPs beim hepatozellulären Karzinom liegen bisher wenige Befunde vor. Deshalb erfolgte zunächst die Bestimmung der Expression von Mitgliedern des BMP-Netzwerkes und von Aktivinrezeptoren als spezifische Rezeptoren für BMPs. Dafür wurden die Gene bei den drei etablierten humanen HCC-Zelllinien Hep3B, HepG2 und Sk-Hep1 sowohl mittels qualitativer RT-PCR als auch mittels quantitativer realtime-PCR untersucht.

4.1.1 Untersuchung mittels RT-PCR und Agarosegelelektrophorese

Zur Untersuchung wurde die Gesamt-RNA aus den Zellen isoliert und die cDNA synthetisiert. Es erfolgte der Nachweis der Expression mittels qualitativer RT-PCR und anschließender Agarosegelelektrophorese. Zur Kontrolle wurde das Housekeeping-Gen β -Aktin mitbestimmt. Die Ergebnisse sind in **Tab. 12** dargestellt.

In den drei untersuchten humanen HCC-Zelllinien ergibt sich gemäß der **Tab. 12** eine differentielle Expression der Komponenten des BMP-Signalsystems. Hinsichtlich des Housekeeping-Gens β -Aktin zeigt sich bei den drei Zelllinien eine ähnliche Expression.

Bei der Zelllinie Hep3B kann gegenüber Aktin und den anderen untersuchten Genen eine stark erhöhte Expression von BMP-2 mittels RT-PCR und Agarosegelelektrophorese nachgewiesen werden. Dem gegenüber ist kein Nachweis der Expression von BMP-3, BMP-5, BMP-6 und BMP-7 möglich. Mittels RT-PCR wird die Anwesenheit von mRNA des BMP-Rezeptors IA, des BMP-Rezeptors IB und des BMP-Rezeptors II demonstriert. Hierbei zeigt sich eine erhöhte Expression des BMP-Rezeptors IA und IB gegenüber dem BMP-Rezeptor II. Des Weiteren wird mRNA der Aktivinrezeptoren IA, IB und IIA mittels RT-PCR identifiziert. Die Aktivinrezeptoren IA, IB und IIA weisen eine vergleichbare Expression auf. Verglichen mit diesen ist die Expression des Aktivinrezeptors IIB schlecht beurteilbar. Von den untersuchten BMP-Inhibitoren kann nur mRNA des BMP-Inhibitors Dan detektiert werden. Die weiteren BMP-Inhibitoren Gremlin, Noggin und Chordin scheinen bei der Zelllinie Hep3B nicht exprimiert zu werden.

Tab. 12 Relative mRNA-Expression von Mitgliedern des BMP-Netzwerkes in drei humanen HCC-Zelllinien

Untersuchte Gene	Hep3B	HepG2	Sk-Hep1
β -Aktin	+	+	+
BMP-2	++	+	+
BMP-3	-	-	-
BMP-5	-	-	-
BMP-6	-	(-)	-
BMP-7	-	-	-
BMPR-IA	++	+	+
BMPR-IB	++	-	(+)
BMPR-II	+	+	+
AktR-IA	+	+	+
AktR-IB	+	+	+
AktR-IIA	+	-	+
AktR-IIB	(+)	+	+
Gremlin	(-)	-	+
Noggin	-	-	-
Dan	+	+	+
Chordin	-	+	-

Die + präsentieren die nach qualitativer Auswertung eingestuft Konzentrationen von BMPs, BMP-Rezeptoren, Aktivinrezeptoren und BMP-Inhibitoren basierend auf RT-PCRs. Die Untersuchung erfolgte bei den drei humanen HCC-Zelllinien Hep3B, HepG2 und Sk-Hep1. Aus der jeweiligen Zelllinie wurde Gesamt-RNA isoliert und cDNA synthetisiert. Die Untersuchung der Expressionen erfolgte mittels RT-PCR und Agarosegelelektrophorese. Die Banden wurden qualitativ beurteilt. Es gilt: ++ stark exprimiert, + exprimiert, (+) (-) Expression schlecht beurteilbar, - nicht nachweisbar.

Bei der Zelllinie HepG2 zeigt sich ein ähnliches Expressionsmuster der Mitglieder des BMP-Netzwerkes. Von den BMPs wird nur mRNA von BMP-2 sicher identifiziert, die Menge scheint jedoch im Vergleich zu der BMP-2-Menge in der Zelllinie Hep3B geringer. Die mRNA von BMP-3, BMP-5 und BMP-7 kann, wie bei Hep3B, nicht nachgewiesen werden. Die Expression von BMP-6 ist fraglich. Bei der Untersuchung der BMP-Rezeptoren zeigt sich eine nachweisbare Expression des BMP-Rezeptors IA und des BMP-Rezeptors II, wohingegen der Nachweis von mRNA des BMP-Rezeptors IB mittels RT-PCR nicht möglich ist. Von den Aktivinrezeptoren wird mRNA der Aktivinrezeptoren IA, IB und IIB detektiert, deren Mengen vergleichbar sind. Der Aktivinrezeptor IIA scheint in der Zelllinie HepG2 nicht präsent zu sein. Zusätzlich zu der Expression von mRNA des BMP-Inhibitors Dan kann

die Expression von mRNA des BMP-Inhibitors Chordin aufgezeigt werden. Die Inhibitoren Gremlin und Noggin sind, genau wie bei der Zelllinie Hep3B, nicht detektierbar.

Bei der dritten untersuchten Zelllinie Sk-Hep1 verhält es sich ähnlich mit der Expression von BMPs verglichen mit Hep3B und HepG2. Auch bei dieser wird nur mRNA von BMP-2 sicher identifiziert, die Menge ist jedoch auch hier geringer als die bei der Zelllinie Hep3B. Die mRNA von BMP-3, BMP-5, BMP-6 und BMP-7 wird mittels RT-PCR nicht nachgewiesen. Von den BMP-Rezeptoren kann die Anwesenheit von mRNA des BMP-Rezeptors IA und des BMP-Rezeptors II demonstriert werden. Die Expression des BMP-Rezeptors IB ist schlecht beurteilbar. Die mRNA der Aktivinrezeptoren IA, IB, IIA und IIB wird in vergleichbarer Menge exprimiert. Zusätzlich zu der Expression von mRNA des BMP-Inhibitors Dan kann die Expression von mRNA des BMP-Inhibitors Gremlin aufgezeigt werden. Die Inhibitoren Noggin und Chordin sind nicht nachweisbar.

Zusammenfassend zeigt sich eine ähnliche, zum Teil jedoch auch differentielle Expression von Mitgliedern des BMP-Signalwegs in den untersuchten Zelllinien. Übereinstimmend kann bei den drei HCC-Zelllinien von den BMPs nur die mRNA von BMP-2 sicher detektiert werden. Von den BMP-Inhibitoren wird nur Dan in allen Zelllinien exprimiert. Sowohl die BMP-Rezeptoren als auch die Aktivinrezeptoren werden, bis auf die oben dargestellten Unterschiede, in ähnlicher Weise exprimiert.

4.1.2 Untersuchung mittels realtime-PCR

Aus den Zellen der verschiedenen Zelllinien wurde die Gesamt-RNA isoliert und cDNA synthetisiert. Die in **Abb. 6** dargestellten Gene wurden anschließend mittels realtime-PCR amplifiziert und quantifiziert. Als interne Kontrolle diente das Housekeeping-Gen β -Aktin.

Die zugrunde liegenden Daten wurden aus zwei Versuchsdurchläufen mit jeweiliger Doppelbestimmung gewonnen. Die erhaltenen Transkriptmengen wurden gemittelt und auf β -Aktin abgeglichen. Die Farbbalken in **Abb. 6** stellen eine quantitative Einordnung der Expressionshöhen der untersuchten Gene dar. Die Expressionshöhen werden in hoch, mittel und niedrig unterteilt. Nicht nachweisbare Gene werden als nicht detektierbar angegeben.

In der **Abb. 6** ist das durch realtime-PCR ermittelte Expressionsmuster der Mitglieder des BMP-Signalwegs in den drei etablierten humanen HCC-Zelllinien Hep3B, HepG2 und Sk-Hep1 dargestellt. Anhand der mittels Farbbalken gewählten Darstellung zeigt sich eine differentielle Expression der Mitglieder des BMP-Systems in den untersuchten Zelllinien.

	Hep3B	HepG2	Sk-Hep1
BMP2			
BMP3			
BMP5			
BMP6			
BMP7			
BMPRIA			
BMPRIB			
BMPRII			
AktRIA			
AktRIB			
AktRIIA			
AktRIIB			
Gremlin			
Noggin			
Dan			
Chordin			

high	medium	low	undetectable

Abb. 6 Durch realtime-PCR ermitteltes Expressionsmuster der Mitglieder des BMP-Signalwegs in drei etablierten humanen HCC-Zelllinien.

Aus den Zellen wurde die Gesamt-RNA isoliert und die cDNA synthetisiert. Die Genexpression wurde anschließend mittels realtime-PCR quantifiziert. Als interne Kontrolle diente das Housekeeping-Gen β -Aktin. Die zugrunde liegenden Daten wurden aus zwei Versuchsdurchläufen mit jeweiliger Doppelbestimmung gewonnen. Die erhaltenen Transkriptmengen wurden gemittelt und auf β -Aktin abgeglichen. Die Farbbalken stellen eine quantitative Einordnung der Expressionshöhen der untersuchten Gene dar. Das Spektrum der Expressionshöhen umfasst den Bereich zwischen $3,88 \times 10^0$ als höchsten und $5,67 \times 10^{-4}$ als niedrigsten Expressionswert. Die Expressionshöhen werden in hoch, mittel und niedrig unterteilt. Nicht nachweisbare Gene werden als nicht detektierbar angegeben.

Anhand der Darstellung fällt auf, dass in der Zelllinie Hep3B die meisten Gene, im Vergleich zu den anderen Zelllinien, einen höheren Expressionslevel aufweisen. Die untersuchten Gene liegen hierbei etwa gleich oder höher exprimiert vor als bei den Zelllinien HepG2 und Sk-Hep1. Hoch exprimiert wird bei der Zelllinie Hep3B mRNA des BMP-Rezeptors IA, des Aktivinrezeptors IA, des Aktivinrezeptors IIB sowie die BMP-Inhibitoren Dan und Chordin.

Mittlere Expressionslevel können bei BMP-2 und BMP-7, beim BMP-Rezeptor IB, beim Aktivinrezeptor IIA und beim BMP-Inhibitor Noggin dokumentiert werden. Niedrige Expressionslevel finden sich bei BMP-5, BMP-6, beim BMP-Rezeptor II und beim Aktivinrezeptor IB. Mittels realtime-PCR konnte mRNA des Gens BMP-3 als auch des BMP-Inhibitors Gremlin hingegen nicht detektiert werden.

Bei der Zelllinie HepG2 werden, übereinstimmend mit Hep3B, der BMP-Rezeptor IA, der Aktivinrezeptor IIB und der BMP-Inhibitor Chordin hoch exprimiert. Der Aktivinrezeptor IA und der BMP-Inhibitor Dan weisen im Unterschied jedoch ein mittleres Expressionslevel auf, ebenso BMP-7, der Aktivinrezeptor IIA und der BMP-Inhibitor Noggin. Bei BMP-2, BMP-6, beim BMP-Rezeptor IB und beim Aktivinrezeptor IB zeigt sich nur eine niedrige Expression. Nicht detektierbar ist mRNA von BMP-3, BMP5, vom BMP-Rezeptor II und vom BMP-Inhibitor Gremlin.

Bei der dritten untersuchten Zelllinie Sk-Hep1 wird nur mRNA vom BMP-Rezeptor IA und vom BMP-Inhibitor Chordin hoch exprimiert. Die überwiegende Zahl der untersuchten Gene weisen mittlere Expressionshöhen auf. Dazu zählen BMP-7, der BMP-Rezeptor IB, der Aktivinrezeptor IA, der Aktivinrezeptor IIA und der Aktivinrezeptor IIB sowie die BMP-Inhibitoren Noggin und Dan. Niedrig exprimiert werden BMP-2, BMP-5, BMP-6, der BMP-Rezeptor II und der Aktivinrezeptor IB. Übereinstimmend mit den Zelllinien Hep3B und HepG2 sind auch bei Sk-Hep1 BMP-3 und der BMP-Inhibitor Gremlin nicht detektierbar.

4.2 Untersuchung der Interaktionen des BMP-Systems und des Thrombin-/PAR-Systems auf Transkriptionsebene mittels Inkubationsversuchen und realtime-PCR

Über mögliche Interaktionen des BMP-Systems und des Thrombin-/PAR-Systems liegen wenige Informationen vor. Auf Grundlage dessen wurden mögliche Regulationen zwischen Mitgliedern beider Signalsysteme mittels Inkubationsversuchen und realtime-PCR auf Transkriptionsebene untersucht.

Die Zellen wurden für 4h und 24h inkubiert. Die Expression der untersuchten Gene wurde mittels realtime-PCR quantifiziert. Als interne Kontrolle diente das Housekeeping-Gen β -Aktin. Auf dieses wurden die ermittelten Transkriptmengen abgeglichen und im Anschluss auf die Kontrolle, serumfreies Medium, bezogen. Die Versuche wurden mehrfach durchgeführt und abschließend gemittelt. Auf Grund der dennoch geringen Anzahl an Versuchsdurchläufen wurde keine Statistik durchgeführt.

4.2.1 Einfluss von PAR-Agonisten auf die Expression von Mitgliedern und von Zielgenen des BMP-Systems

Die Rolle der Proteinase-aktivierten Rezeptoren (PAR₁, PAR₂, PAR₃ und PAR₄) in der Karzinogenese verschiedener Tumoren ist bereits in zahlreichen Publikationen gezeigt. Ebenso konnten die Expression sowie Effekte der PARs 1, 2 und 4 auf Signalweiterleitungs- und zellulärer Ebene in HCC-Zellen aufgezeigt werden (Kaufmann et al. 2007).

Basierend auf diesen Vorkenntnissen wurde in dem ersten Teil der Promotionsarbeit untersucht, ob die Expression der oben genannten Komponenten des BMP-Signalnetzwerkes durch die reine Inkubation mit Agonisten von Proteinase-aktivierten Rezeptoren reguliert werden kann und ob somit ein regulatorischer Zusammenhang zwischen den PARs und dem BMP-System besteht. Zudem wurde der Einfluss auf die BMP-Zielgene ID-1 und ID-2 untersucht.

Dafür wurden PAR-Subtyp-spezifische PAR-Agonisten verwendet. Diese sind Peptide und wurden in Inkubationsversuchen bei den drei humanen HCC-Zelllinien Hep3B, HepG2 und Sk-Hep1 eingesetzt. Die Zellen wurden für 4h und 24h mit jeweils 100 µM des PAR₁-Agonistes, 10 µM des PAR₂-Agonisten und 400 µM des PAR₄-Agonisten inkubiert. Aus den Zellen wurde die Gesamt-RNA isoliert und die cDNA synthetisiert. Die Genexpression wurde anschließend mittels realtime-PCR quantifiziert. Als interne Kontrolle diente das Housekeeping-Gen β -Aktin. Der Versuch wurde zweifach durchgeführt (n=2). Die erhaltenen Transkriptmengen wurden auf β -Aktin abgeglichen und auf die Kontrolle, serumfreies Medium, bezogen. Die so erhaltenen Expressionslevel wurden anschließend gemittelt und grafisch dargestellt. Die Kontrolle nimmt hierbei den Wert 1 an. Beträgt der Expressionslevel der einzelnen Gene nach Inkubation < 0,5 oder > 2,5, so wird von einer starken Regulation ausgegangen.

4.2.1.1 Zelllinie Hep3B

Bei der Zelllinie Hep3B wurden die Expressionslevel der in **Abb. 7** bis **Abb. 11** dargestellten Gene untersucht. Der Kontrollwert beträgt hierbei stets 1. Unter Berücksichtigung der Standardabweichungen sind die Ergebnisse kritisch zu bewerten.

Bei BMP-2 zeigt sich eine differente Expression. Die Inkubation mit dem PAR₁-Agonisten führt nach 4h nur zu einer geringfügigen Abnahme der Expression auf das 0,8-fache, während die Expression nach 24h unverändert bleibt. Wurde mit dem PAR₂-Agonisten inkubiert, so zeigt sich nach 4h und 24h eine gegensätzliche Expression. Das Maximum, eine rund 1,5-fache Expression, ist nach 4h zu verzeichnen. Nach 24h beträgt das Expressionslevel nur 0,8.

Das Expressionslevel von BMP-2 nach Inkubation mit dem PAR₄-Agonisten verhält sich wie nach der Inkubation mit dem PAR₁-Agonisten (**Abb. 7A**).

Für BMP-3 konnte keine Expression nachgewiesen werden, die demnach nicht dargestellt wurde.

Bei BMP-5 ist das niedrigste Expressionslevel von 0,57 nach 4-stündiger Inkubation mit dem PAR₁-Agonisten zu verzeichnen. Der 24h-Wert bleibt unbeeinflusst. Die Inkubation mit dem PAR₂-Agonisten führt sowohl nach 4h als auch nach 24h zu einer leicht erhöhten Expression, dabei liegt das Maximum bei etwa 1,5. Nach der Inkubation mit dem PAR₄-Agonisten bleibt die Expression von BMP-5, bis auf eine leicht auf 0,8 erniedrigte Expression nach 4h, nach 24h nahezu unverändert (**Abb. 7B**).

Bei BMP-6 ist bei allen Inkubationsansätzen sowohl nach 4h als auch nach 24h eine Abnahme der Expressionslevel im Vergleich zur Kontrolle zu verzeichnen. Das Minimum, eine Halbierung der Expression, liegt nach der Inkubation mit dem PAR₂-Agonisten nach 24h vor. Relativ unverändert bleibt der 24h-Wert unter Einfluss des PAR₄-Agonisten (**Abb. 7C**).

Bei BMP-7 sind die Expressionslevel nach Inkubation mit dem PAR₁-Agonisten als auch mit dem PAR₂-Agonisten vergleichbar. In beiden Fällen kommt es sowohl nach 4h als auch nach 24h zu einer sehr geringen Abnahme der Expression. Im Gegensatz dazu findet sich ein leicht erhöhtes Expressionslevel nach Inkubation mit dem PAR₄-Agonisten zu beiden Zeiten (**Abb. 7D**).

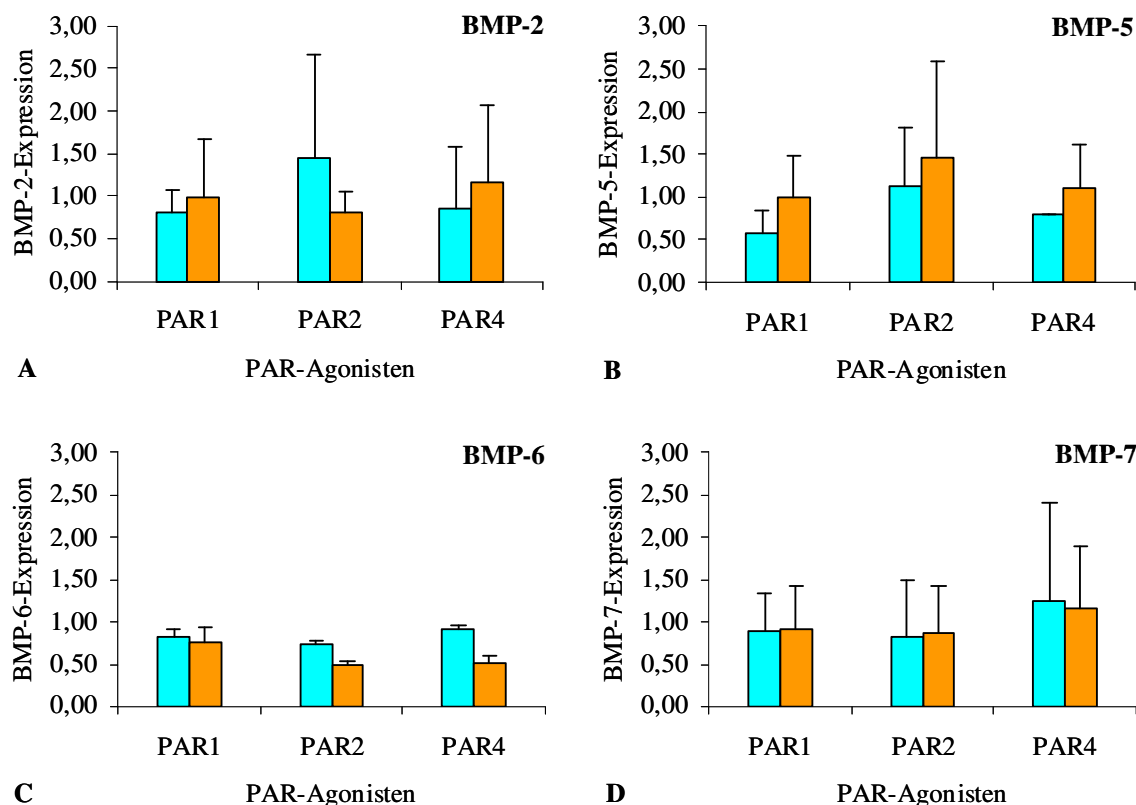


Abb. 7 Expressionslevel von BMP-2, BMP-5, BMP-6 und BMP-7 bei der Zelllinie Hep3B im Inkubationsversuch mit PAR-Agonisten PAR₁, PAR₂ und PAR₄.

Die Zellen wurden für 4h und 24h mit jeweils 100 µM des PAR₁-Agonisten, 10 µM des PAR₂-Agonisten und 400 µM des PAR₄-Agonisten inkubiert. Aus den Zellen wurde die Gesamt-RNA isoliert und die cDNA synthetisiert. Die Genexpression der BMPs wurde anschließend mittels realtime-PCR quantifiziert. Als interne Kontrolle diente das Housekeeping-Gen β -Aktin. Der Versuch wurde zweifach durchgeführt (n=2). Die erhaltenen Transkriptmengen wurden auf β -Aktin abgeglichen und auf die Kontrolle (serumfreies Medium) bezogen. Die so erhaltenen Expressionslevel wurden anschließend gemittelt und grafisch dargestellt. Die Kontrolle nimmt hierbei den Wert 1 an. Hierbei erscheinen die 4h-Werte als hellblaue und die 24h-Werte als orange Balken. Abb. A stellt das Expressionslevel von BMP-2 dar, Abb. B zeigt das Expressionslevel von BMP-5, Abb. C zeigt das Expressionslevel von BMP-6 und Abb. D stellt das Expressionslevel von BMP-7 dar.

Bei dem BMP-Rezeptor IA bewirkt die Inkubation mit dem PAR₁-Agonisten als auch mit dem PAR₂-Agonisten einen relativ gleichbleibenden bis gering abnehmenden Expressionslevel nach 4h und 24h. Ein 0,84-faches Expressionslevel als Minimum liegt 4h nach Inkubation mit dem PAR₂-Agonisten vor. Während der 4 h-Wert unter dem Einfluss des PAR₄-Agonisten nahezu unverändert bleibt, führt dieser nach 24h zu einem Anstieg der Expression um 1,5 (**Abb. 8A**).

Unter dem Einfluss des PAR₁-Agonisten, des PAR₂-Agonisten und des PAR₄-Agonisten kommt es zu einem Rückgang des Expression des BMP-Rezeptors IB nach 4h und 24h. Die Effekte des PAR₁- und des PAR₄-Agonisten auf die Expression sind vergleichbar. In beiden Fällen ist das Expressionslevel zudem nach 24h geringer als nach 4h und beträgt mit etwa 0,38 für den PAR₁-Agonisten und 0,31 für den PAR₄-Agonisten etwa ein Drittel der

ursprünglichen Expressionshöhe. Der PAR₂-Agonist führt zu einem geringeren Rückgang. Eine Halbierung der Expression liegt hierbei nach 4h vor (**Abb. 8B**).

Im Fall des BMP-Rezeptors II führt die Inkubation mit den PAR-Agonisten nach 4h zu einem geringfügigen Rückgang der Expressionshöhe, während diese 24h nach Inkubation mit dem PAR₁- als auch mit dem PAR₂-Agonisten nahezu unverändert bleibt. Eine etwa 1,3-fach erhöhte Expression des BMP-Rezeptors II ist im Gegensatz dazu 24h nach Inkubation mit dem PAR₄-Agonisten zu verzeichnen (**Abb. 8C**).

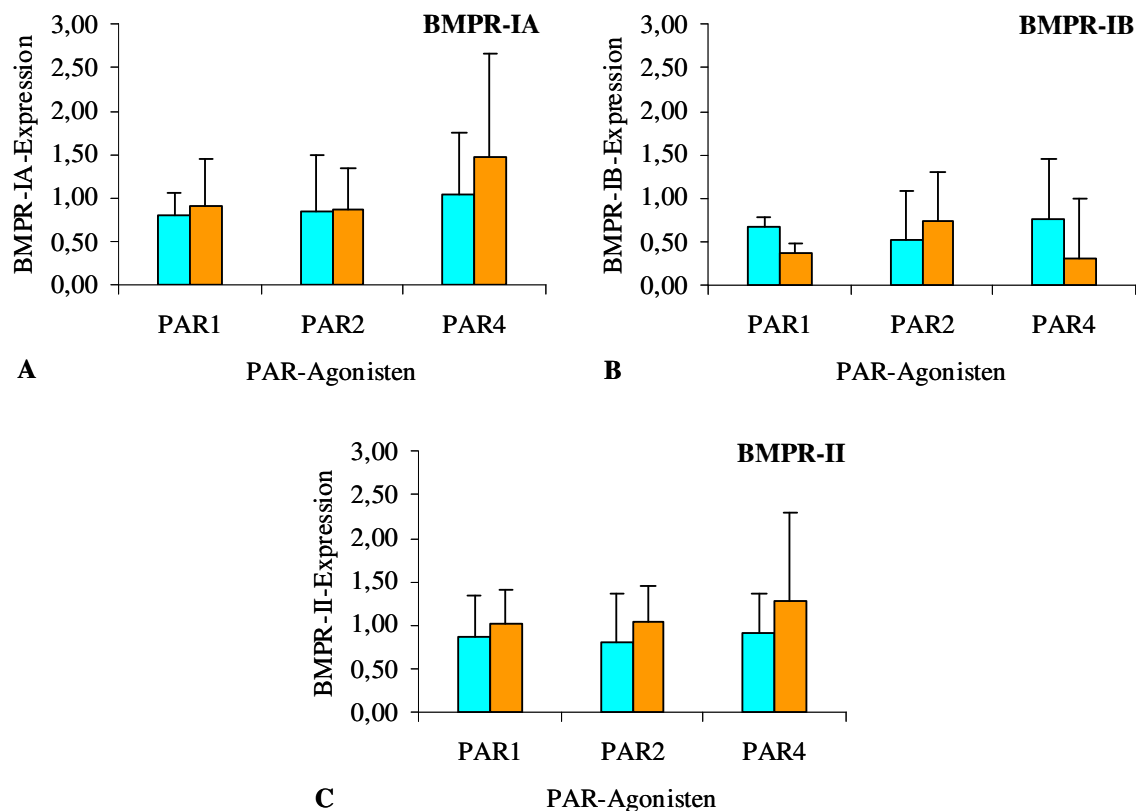


Abb. 8 Expressionslevel der BMP-Rezeptoren BMPR-IA, BMPR-IB und BMPR-II bei der Zelllinie Hep3B im Inkubationsversuch mit PAR-Agonisten PAR₁, PAR₂ und PAR₄.

Die Zellen wurden für 4h und 24h mit jeweils 100 µM des PAR₁-Agonisten, 10 µM des PAR₂-Agonisten und 400 µM des PAR₄-Agonisten inkubiert. Aus den Zellen wurde die Gesamt-RNA isoliert und die cDNA synthetisiert. Die Genexpression der BMP-Rezeptoren wurde anschließend mittels realtime-PCR quantifiziert. Als interne Kontrolle diente das Housekeeping-Gen β -Aktin. Der Versuch wurde zweifach durchgeführt (n=2). Die erhaltenen Transkriptmengen wurden auf β -Aktin abgeglichen und auf die Kontrolle (serumfreies Medium) bezogen. Die so erhaltenen Expressionslevel wurden anschließend gemittelt und grafisch dargestellt. Die Kontrolle nimmt hierbei den Wert 1 an. Hierbei erscheinen die 4h-Werte als hellblaue und die 24h-Werte als orange Balken. Abb. **A** stellt das Expressionslevel vom BMPR-IA dar, Abb. **B** zeigt das Expressionslevel vom BMPR-IB und Abb. **C** zeigt das Expressionslevel vom BMPR-II.

Der mRNA-Gehalt des Aktivinrezeptors IA nimmt nach 4-stündiger Inkubation mit dem PAR₁-Agonisten leicht ab, so dass als Minimum nur noch der 0,74-fache Gehalt an mRNA vorliegt. Im Gegensatz dazu ist die Expression 24h nach Inkubation mit dem PAR₁-Agonisten als auch 4h und 24h nach Inkubation mit dem PAR₂-Agonisten relativ unverändert bis minimal abnehmend. Nahezu gleichbleibend ist die Expression unter Einfluss des PAR₄-Agonisten (**Abb. 9A**).

Bei dem Aktivinrezeptor IB führt die Inkubation mit dem PAR₁-Agonisten nach 4h zu einer geringen Abnahme der Expression auf 0,8, während die Expression nach 24h unverändert bleibt. Wurde mit dem PAR₂-Agonisten inkubiert, so zeigt sich nach 4h und nach 24h eine verminderte Expression. Das Minimum, eine Abnahme der Expression auf 0,68, ist nach 4h zu verzeichnen. Der PAR₄-Agonist führt zu einer 4-fachen Zunahme der Expression nach 4h. Nach 24h ist Normalniveau erreicht (**Abb. 9B**).

Unter dem Einfluss des PAR₁-Agonisten bleibt das Expressionslevel des Aktivinrezeptors IIA in etwa gleich. Unter dem Einfluss des PAR₂-Agonisten nimmt das Expressionslevel sowohl nach 4h als auch nach 24h, mit einer nur noch 0,75-fachen Expression, leicht ab. Gegensätzlich verhält es sich nach der Inkubation mit dem PAR₄-Agonisten. Dieser führt, mit einer um 1,38-fach erhöhten Expression als Maximum nach 24h, zu einem Anstieg des Expressionslevels (**Abb. 9C**).

Bei dem Aktivinrezeptor IIB bewirkt die Inkubation mit dem PAR₁-Agonisten als auch mit dem PAR₂-Agonisten einen geringfügigen Rückgang der Expression nach 4h. Ein 0,74-faches Expressionslevel als Minimum liegt bei 4h nach Inkubation mit dem PAR₂-Agonisten vor. Die Expression wird hingegen nach 24h kaum beeinflusst. Relativ unbeeinflusst bleibt ebenso die Expression nach Inkubation mit dem PAR₄-Agonisten (**Abb. 9D**).

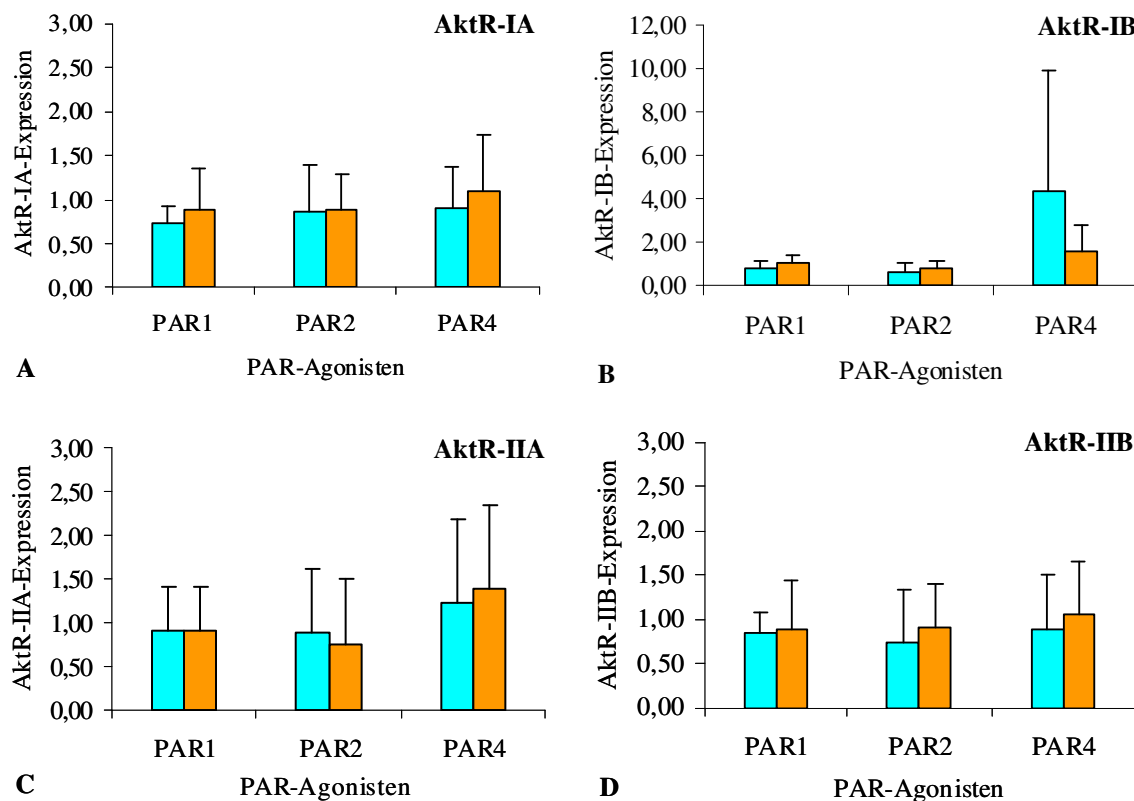


Abb. 9 Expressionslevel der Aktivinrezeptoren AktR-IA, AktR-IB, AktR-IIA und AktR-IIB bei der Zelllinie Hep3B im Inkubationsversuch mit PAR-Agonisten PAR₁, PAR₂ und PAR₄.

Die Zellen wurden für 4h und 24h mit jeweils 100 µM des PAR₁-Agonisten, 10 µM des PAR₂-Agonisten und 400 µM des PAR₄-Agonisten inkubiert. Aus den Zellen wurde die Gesamt-RNA isoliert und die cDNA synthetisiert. Die Genexpression der Aktivinrezeptoren wurde anschließend mittels realtime-PCR quantifiziert. Als interne Kontrolle diente das Housekeeping-Gen β -Aktin. Der Versuch wurde zweifach durchgeführt (n=2). Die erhaltenen Transkriptmengen wurden auf β -Aktin abgeglichen und auf die Kontrolle (serumfreies Medium) bezogen. Die so erhaltenen Expressionslevel wurden anschließend gemittelt und grafisch dargestellt. Die Kontrolle nimmt hierbei den Wert 1 an. Hierbei erscheinen die 4h-Werte als hellblaue und die 24h-Werte als orange Balken. Abb. **A** stellt das Expressionslevel vom AktR-IA dar, Abb. **B** zeigt das Expressionslevel vom AktR-IB, Abb. **C** zeigt das Expressionslevel vom AktR-IIA und Abb. **D** stellt das Expressionslevel vom AktR-IIB dar.

Bei dem BMP-Inhibitor Gremlin ist nach Inkubation mit dem PAR₁- und dem PAR₂-Agonisten sowohl nach 4h als auch nach 24h eine Abnahme der Expressionslevel im Vergleich zur Kontrolle zu verzeichnen. Das Minimum liegt mit einer Abnahme des Expressionslevels auf 0,62 nach Inkubation mit dem PAR₂-Agonisten nach 24h vor. Unter Einfluss des PAR₄-Agonisten nimmt nach 4h die Expression leicht ab, wohingegen sie nach 24h unverändert bleibt (**Abb. 10A**).

Bei Noggin ist kein Einfluss des PAR₁-Agonisten auf die Expression zu verzeichnen. Der PAR₂-Agonist bewirkt einen geringen Rückgang der Expression nach 4h. Nach 24h bleibt dieser Effekt aus. Im Gegensatz dazu zeigt sich eine Abnahme der Expression nach Inkubation mit dem PAR₄-Agonisten bis auf ein Minimum von 0,76 nach 4h (**Abb. 10B**).

Bei Dan bewirkt die Inkubation mit dem PAR₁- und dem PAR₂-Agonisten nach 4h einen minimalen Rückgang des mRNA-Gehalts, während dieser nach jeweils 24h nahezu unverändert vorliegt. Unverändert bleibt die Expression auch 4h nach Inkubation mit dem PAR₄-Agonisten. Unverändert bis minimal erhöht ist diese auch nach 24h (**Abb. 10C**).

Die Expression des BMP-Inhibitors Chordin wird durch den PAR₁- und den PAR₂-Agonisten nicht beeinflusst. Ein maximal 1,2-fach erhöhtes Expressionslevel zeigt sich unter Einwirkung des PAR₄-Agonisten (**Abb. 10D**).

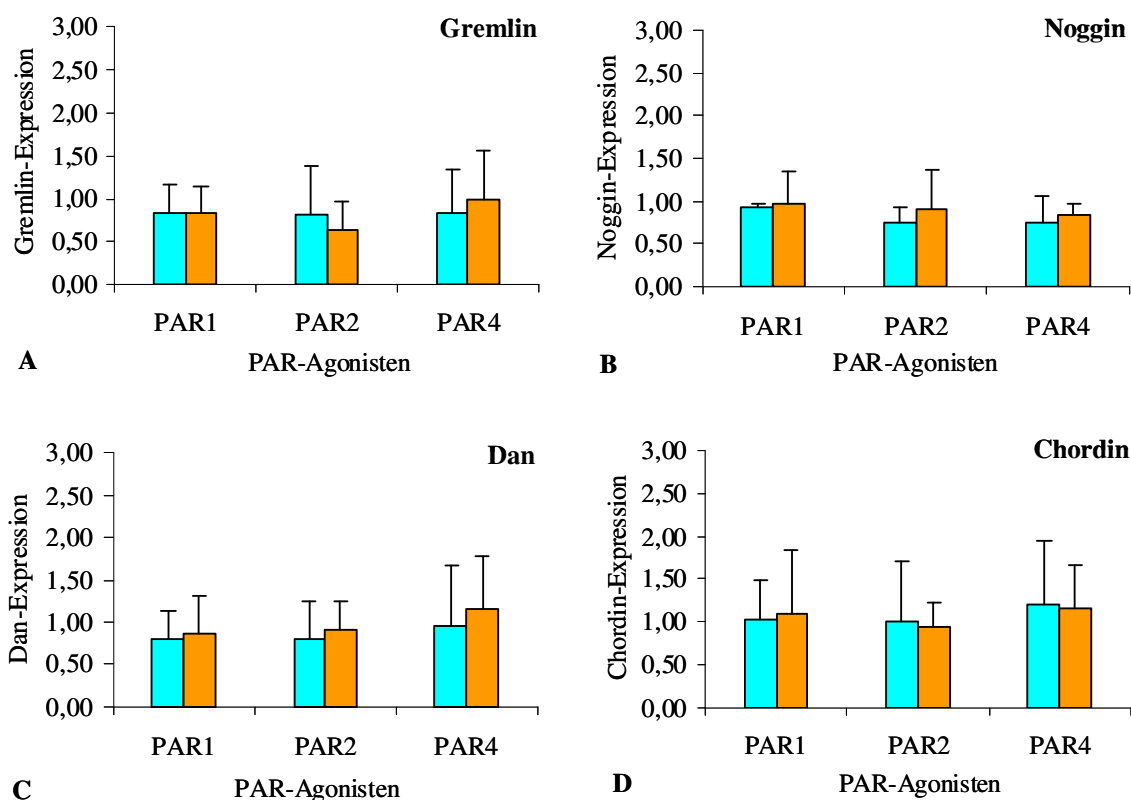


Abb. 10 Expressionslevel der BMP-Inhibitoren Gremlin, Noggin, Dan und Chordin bei der Zelllinie Hep3B im Inkubationsversuch mit PAR-Agonisten PAR₁, PAR₂ und PAR₄.

Die Zellen wurden für 4h und 24h mit jeweils 100 µM des PAR₁-Agonisten, 10 µM des PAR₂-Agonisten und 400 µM des PAR₄-Agonisten inkubiert. Aus den Zellen wurde die Gesamt-RNA isoliert und die cDNA synthetisiert. Die Genexpression der BMP-Inhibitoren wurde anschließend mittels realtime-PCR quantifiziert. Als interne Kontrolle diente das Housekeeping-Gen β -Aktin. Der Versuch wurde zweifach durchgeführt (n=2). Die erhaltenen Transkriptmengen wurden auf β -Aktin abgeglichen und auf die Kontrolle (serumfreies Medium) bezogen. Die so erhaltenen Expressionslevel wurden anschließend gemittelt und grafisch dargestellt. Die Kontrolle nimmt hierbei den Wert 1 an. Hierbei erscheinen die 4h-Werte als hellblaue und die 24h-Werte als orange Balken. Abb. A stellt das Expressionslevel von Gremlin dar, Abb. B zeigt das Expressionslevel von Noggin, Abb. C zeigt das Expressionslevel von Dan und Abb. D stellt das Expressionslevel von Chordin dar.

Bei dem BMP-Zielgen ID-1 führt der Einfluss des PAR₁-Agonisten zu keiner Änderung des Expressionslevels. Ebenso unbeeinflusst bleibt dieses 4h nach Inkubation mit dem PAR₂-Agonisten. Nach 24h ist im Gegensatz dazu jedoch eine Halbierung des Expressionslevels zu verzeichnen. Der PAR₄-Agonist bewirkt sowohl nach 4h als auch nach 24h eine geringe Abnahme auf minimal 0,73 (**Abb. 11A**).

Der PAR₁- und der PAR₄-Agonisten bewirken bei dem BMP-Zielgen ID-2 keine Änderung der Expression. Wurde jedoch mit dem PAR₂-Agonisten inkubiert, so nahm die Expression sowohl nach 4h, mit einem minimalen Wert von etwa 0,6, als auch nach 24h ab (**Abb. 11B**).

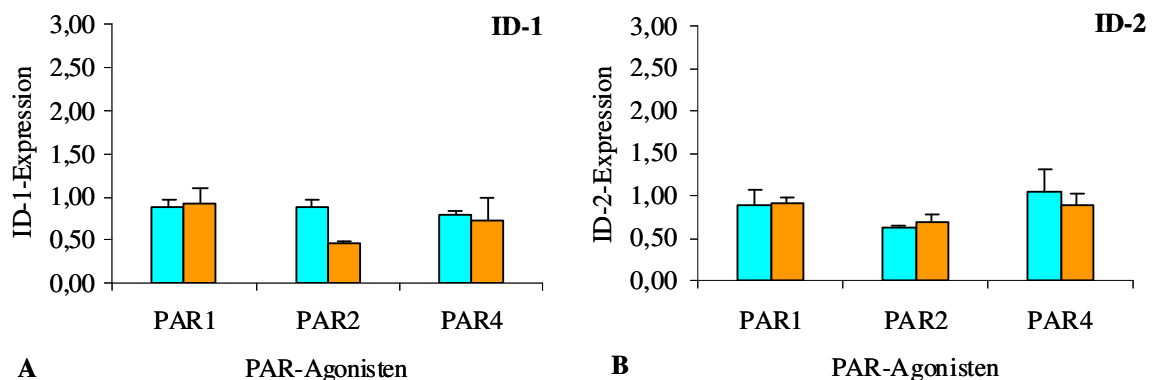


Abb. 11 Expressionslevel der BMP-Zielgene ID-1 und ID-2 bei der Zelllinie Hep3B im Inkubationsversuch mit PAR-Agonisten PAR₁, PAR₂ und PAR₄.

Die Zellen wurden für 4h und 24h mit jeweils 100 µM des PAR₁-Agonisten, 10 µM des PAR₂-Agonisten und 400 µM des PAR₄-Agonisten inkubiert. Aus den Zellen wurde die Gesamt-RNA isoliert und die cDNA synthetisiert. Die Genexpression von ID-1 und ID-2 wurde anschließend mittels realtime-PCR quantifiziert. Als interne Kontrolle diente das Housekeeping-Gen β -Aktin. Der Versuch wurde zweifach durchgeführt (n=2). Die erhaltenen Transkriptmengen wurden auf β -Aktin abgeglichen und auf die Kontrolle (serumfreies Medium) bezogen. Die so erhaltenen Expressionslevel wurden anschließend gemittelt und grafisch dargestellt. Die Kontrolle nimmt hierbei den Wert 1 an. Hierbei erscheinen die 4h-Werte als hellblaue und die 24h-Werte als orange Balken. Abb. A stellt das Expressionslevel von ID-1 dar, Abb. B zeigt das Expressionslevel von ID-2.

4.2.1.2 Zelllinien HepG2 und Sk-Hep1

Bei den Zelllinien HepG2 und Sk-Hep1 wurde ebenso die Expressionsänderung der unter 4.2.1.1 exemplarisch dargestellten Gene nach Inkubation mit spezifischen PAR-Agonisten untersucht. Die Ergebnisse sind in Form von Diagrammen im Anhang aufgeführt. Unter Berücksichtigung der Standardabweichungen sind die Ergebnisse auch hierbei kritisch zu bewerten.

4.2.2 Einfluss von rhBMP-2 auf Zielgene des BMP-Systems und des Thrombin-Systems

Um mögliche Interaktionen zwischen dem BMP-System und dem Thrombin-/PAR-System genauer zu analysieren, wurden weitere Inkubationsversuche durchgeführt.

Während im ersten Teil der Promotionsarbeit nur untersucht wurde, ob die reine Inkubation mit Agonisten von Proteinase-aktivierten Rezeptoren (PAR₁, PAR₂ und PAR₄) zu einer Expressionsänderung von BMP-Netzwerkkomponenten führt und somit ein regulatorischer Zusammenhang zwischen den PARs und dem BMP-System besteht, wurden im zweiten Teil der Arbeit funktionelle Zusammenhänge auf Ebene der Signalwege analysiert.

Der Schwerpunkt der Arbeit lag dabei auf der Untersuchung der Wechselwirkung von Thrombin/PARs mit dem BMP-Signalweiterleitungssystem. PAR₁ und PAR₄ stellen die wesentlichen Mediatoren der zellulären Effekte von Thrombin dar. Somit basierten weitere Untersuchungen nur noch auf dem Thrombin-abhängigen Signaling. Da PAR₂ nicht durch Thrombin aktiviert wird, war dieser Rezeptor nicht mehr Gegenstand anschließender Untersuchungen.

Zur weiteren Analyse möglicher Interaktionen des BMP-Netzwerkes mit dem Thrombin-/PAR-System wurde rhBMP-2 als natürlicher BMP-Rezeptor-Agonist eingesetzt und dessen Einfluss sowohl auf das eigene BMP-System als auch auf das Thrombin-/PAR-System bei den Zelllinien Hep3B, HepG2 und Sk-Hep1 untersucht. Die Änderungen der Expression der BMP-Zielgene ID-1 und ID-2 und der Thrombin-Zielgene VEGF und Met wurden mittels realtime-PCR quantifiziert. Die Zellen wurden für 4h und 24h mit jeweils 10 ng/ml, 50 ng/ml und 100 ng/ml rhBMP-2 inkubiert. Aus den Zellen wurde die Gesamt-RNA isoliert und die cDNA synthetisiert. Die Genexpression wurde anschließend mittels realtime-PCR quantifiziert. Als interne Kontrolle diente das Housekeeping-Gen β -Aktin. Es wurden drei unabhängige Versuche in jeweiliger Doppelbestimmung durchgeführt (n=6). Die erhaltenen Transkriptmengen wurden auf β -Aktin abgeglichen und auf die Kontrolle (serumfreies Medium) bezogen. Die so erhaltenen Expressionslevel wurden anschließend gemittelt und grafisch dargestellt. Die Kontrolle nimmt hierbei stets den Wert 1 an. Beträgt der Expressionslevel der einzelnen Gene nach Inkubation < 0,5 oder > 2,5, so wird von einer starken Regulation ausgegangen.

4.2.2.1 Zelllinie Hep3B

Es wurden die Expressionslevel der BMP-Zielgene ID-1 und ID-2 sowie der Thrombin-Zielgene VEGF und Met nach Inkubation mit rhBMP-2 untersucht. Der Kontrollwert beträgt hierbei stets 1.

Bei ID-1 ist mit steigender Konzentration des eingesetzten rhBMP-2 keine Zunahme des Expressionslevels zu verzeichnen. Die Hep3B-Zellen reagieren nur minimal auf die Inkubation mit rhBMP-2. Wurden 10 ng/ml eingesetzt, so ist die Expression nach 4h gering vermindert, während sie nach 24h relativ unverändert vorliegt. Ebenso verhält es sich nach der Inkubation mit 50 ng/ml. Eine weitere Steigerung der eingesetzten Konzentration an rhBMP-2 bleibt ohne Effekt (**Abb. 12A**).

Bei dem BMP-Zielgen ID-2 zeigt sich nach Inkubation mit rhBMP-2 keine konzentrationsabhängige Zunahme des Expressionslevels mit steigender Konzentration des eingesetzten Peptids. Wurden 10 ng/ml bzw. 50 ng/ml rhBMP-2 eingesetzt, so nimmt die Expression in beiden Fällen nach 4h gering ab. Das Minimum, eine Abnahme auf 0,77, wird 4h nach Inkubation mit 50 ng/ml rhBMP-2 erreicht. Unverändert bis minimal erhöht bleibt die Expression hingegen nach 24h. Eine weitere Steigerung der Konzentration des eingesetzten rhBMP-2 auf 100 ng/ml führte sowohl nach 4h als auch nach 24h zu einer geringfügigen Senkung des ID-2-Expressionslevels (**Abb. 12B**). Ein konzentrationsabhängiger Aspekt erscheint in beiden Fällen jedoch unwahrscheinlich.

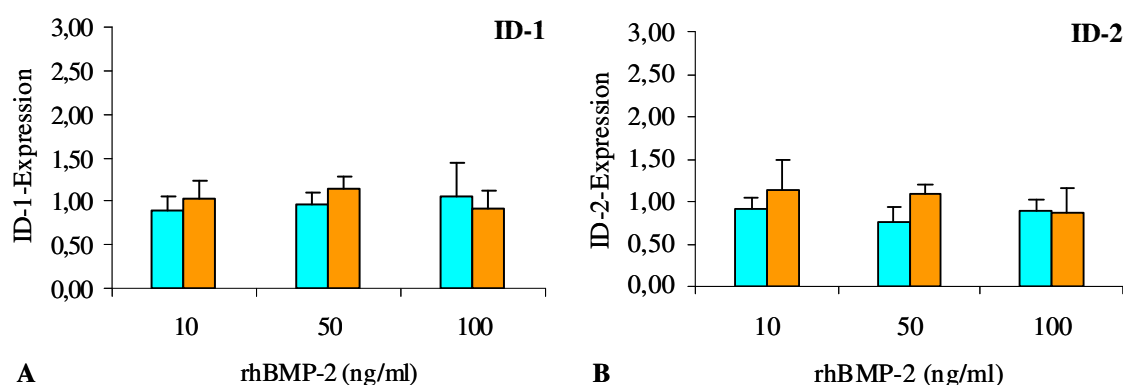


Abb. 12 Expressionslevel der BMP-Zielgene ID-1 und ID-2 bei der Zelllinie Hep3B im Inkubationsversuch mit rh-BMP-2.

Die Zellen wurden für 4h und 24h mit jeweils 10 ng/ml, 50 ng/ml und 100 ng/ml inkubiert. Aus den Zellen wurde die Gesamt-RNA isoliert und die cDNA synthetisiert. Die Genexpression der BMP-Zielgene wurde anschließend mittels realtime-PCR quantifiziert. Als interne Kontrolle diente das Housekeeping-Gen β -Aktin. Es wurden drei unabhängige Versuche in jeweiliger Doppelbestimmung durchgeführt (n=6). Die erhaltenen Transkriptmengen wurden auf β -Aktin abgeglichen und auf die Kontrolle (serumfreies Medium) bezogen. Die so erhaltenen Expressionslevel wurden anschließend gemittelt und grafisch dargestellt. Die Kontrolle nimmt hierbei den Wert 1 an. Hierbei erscheinen die 4h-Werte als hellblaue und die 24h-Werte als orange Balken. Abb. A stellt das Expressionslevel von ID-1 dar, Abb. B zeigt das Expressionslevel von ID-2.

Bei VEGF verhält es sich ähnlich wie bei ID-2. Wurden 10 ng/ml bzw. 50 ng/ml rhBMP-2 eingesetzt, so tritt in beiden Fällen eine Abnahme der Expression mit 0,65-fachem Expressionslevel als Minimum nach 4h auf. Nach 24h führt die Inkubation mit diesen Konzentrationen jeweils zu einer minimalen Zunahme des Expressionslevels. Eine weitere Steigerung der Konzentration des eingesetzten rhBMP-2 auf 100 ng/ml führte sowohl nach 4h als auch nach 24h zu einer geringen Senkung der Expression von VEGF auf minimal etwa 0,8. Bei der Expression von VEGF sind vor allem konzentrationsabhängige Effekte von rhBMP-2 zu verzeichnen. (**Abb. 13A**).

Die Expression von Met blieb nach Inkubation mit geringeren Konzentrationen an rhBMP-2 zu beiden Inkubationszeiten relativ unbeeinflusst. Wurden jedoch mit 100 ng/ml rhBMP-2 als höchste eingesetzte Konzentration inkubiert, so liegt nach 24h eine 1,4-fach gesteigerte Expression des Gens vor (**Abb. 13B**).

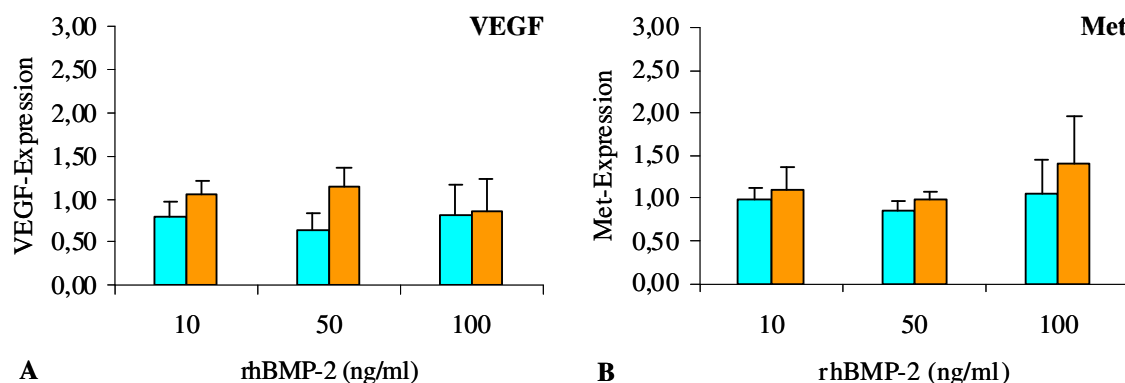


Abb. 13 Expressionslevel der Thrombin-Zielgene VEGF und Met bei der Zelllinie Hep3B im Inkubationsversuch mit rh-BMP-2.

Die Zellen wurden für 4h und 24h mit jeweils 10 ng/ml, 50 ng/ml und 100 ng/ml inkubiert. Aus den Zellen wurde die Gesamt-RNA isoliert und die cDNA synthetisiert. Die Genexpression der Thrombin-Zielgene wurde anschließend mittels realtime-PCR quantifiziert. Als interne Kontrolle diente das Housekeeping-Gen β -Aktin. Es wurden drei unabhängige Versuche in jeweiliger Doppelbestimmung durchgeführt (n=6). Die erhaltenen Transkriptmengen wurden auf β -Aktin abgeglichen und auf die Kontrolle (serumfreies Medium) bezogen. Die so erhaltenen Expressionslevel wurden anschließend gemittelt und grafisch dargestellt. Die Kontrolle nimmt hierbei den Wert 1 an. Hierbei erscheinen die 4h-Werte als hellblaue und die 24h-Werte als orange Balken. Abb. A stellt das Expressionslevel von VEGF dar, Abb. B zeigt das Expressionslevel von Met.

4.2.2.2 Zelllinie HepG2

Es wurden die Expressionslevel der BMP-Zielgene ID-1 und ID-2 sowie der Thrombin-Zielgene VEGF und Met nach Inkubation mit rhBMP-2 untersucht. Der Kontrollwert beträgt hierbei stets 1.

Wurde die Zelllinie HepG2 mit rhBMP-2 inkubiert, so ähnelt die Expression von ID-1 der bei der Zelllinie Hep3B. Bei ID-1 ist mit steigender Konzentration des eingesetzten rhBMP-2

keine Zunahme des Expressionslevels zu verzeichnen. Die HepG2-Zellen reagieren, genau wie Hep3B-Zellen, nur minimal auf die Inkubation mit rhBMP-2. Wurden 10 ng/ml eingesetzt, so bleibt die Expression nach 4h und nach 24h unverändert. Eine Erhöhung der rhBMP-2-Konzentration auf 50 ng/ml führte ebenso nach 4h Inkubationszeit zu keiner Veränderung des Expressionslevels. Wurde für 24h inkubiert, so ist eine etwa 1,3-fach erhöhte Expression zu dokumentieren. Der Expressionslevel ist selbst nach einer weiteren Steigerung der rhBMP-2-Konzentration auf 100 ng/ml gleichbleibend (**Abb. 14A**).

Bei der Untersuchung der Änderung der Expression von ID-2 nach Inkubation mit rhBMP-2 fällt auf, dass kein konzentrationsabhängiger Effekt vorliegt. Dementsprechend ist die Expression, unabhängig von der rhBMP-2-Konzentration, nach 4h stets erniedrigt. Minimal wird ID-2 nach Inkubation mit 50 ng/ml rhBMP-2 exprimiert. Nach 24h liegt, ebenso unabhängig von der eingesetzten Konzentration an rhBMP-2, das Expressionslevel stets geringfügig erhöht vor (**Abb. 14B**).

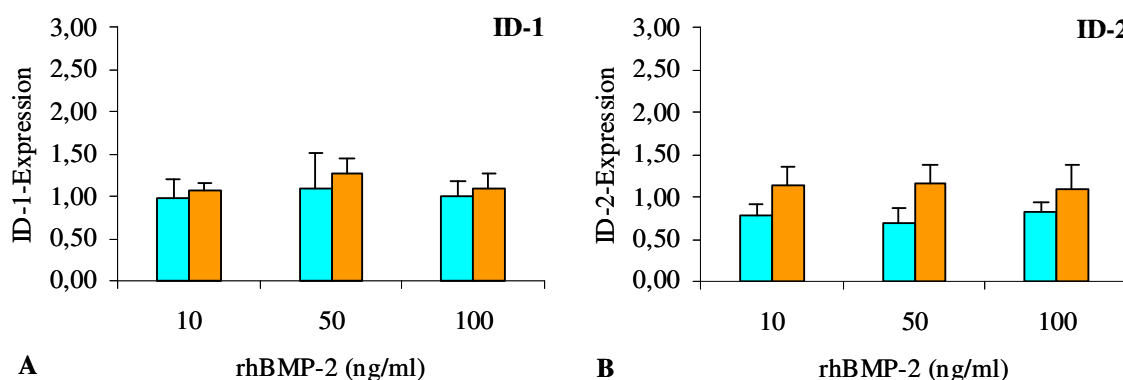


Abb. 14 Expressionslevel der BMP-Zielgene ID-1 und ID-2 bei der Zelllinie HepG2 im Inkubationsversuch mit rh-BMP-2.

Die Zellen wurden für 4h und 24h mit jeweils 10 ng/ml, 50 ng/ml und 100 ng/ml inkubiert. Aus den Zellen wurde die Gesamt-RNA isoliert und die cDNA synthetisiert. Die Genexpression der BMP-Zielgene wurde anschließend mittels realtime-PCR quantifiziert. Als interne Kontrolle diente das Housekeeping-Gen β -Aktin. Es wurden drei unabhängige Versuche in jeweiliger Doppelbestimmung durchgeführt (n=6). Die erhaltenen Transkriptmengen wurden auf β -Aktin abgeglichen und auf die Kontrolle (serumfreies Medium) bezogen. Die so erhaltenen Expressionslevel wurden anschließend gemittelt und grafisch dargestellt. Die Kontrolle nimmt hierbei den Wert 1 an. Hierbei erscheinen die 4h-Werte als hellblaue und die 24h-Werte als orange Balken. Abb. A stellt das Expressionslevel von ID-1 dar, Abb. B zeigt das Expressionslevel von ID-2.

Wenn man die Expression von VEGF nach Inkubation mit rhBMP-2 betrachtet, so ist jeweils nach 4h Inkubationszeit, unabhängig von der Konzentration an rhBMP-2, keine konzentrationsabhängige Steigerung der Expression zu verzeichnen. Nach 24h Inkubationszeit lässt sich ein konzentrationsabhängiger Effekt des Agonisten auf die Expression von VEGF vermuten. Während die Expression nach Inkubation mit 10 ng/ml nahezu unverändert bleibt, steigt diese bei Einsatz höherer Konzentrationen von rhBMP-2 an.

Das Maximum, ein um etwa 1,4-fach gesteigertes Expressionslevel, wird nach Inkubation mit 100 ng/ml rhBMP-2 erreicht. Auch hierbei führt rhBMP-2, vor allem nach 24h, zu konzentrationsabhängigen Veränderungen der VEGF-Expression (**Abb. 15A**).

Die Inkubation mit rhBMP-2 bewirkt bei Met mit steigender Konzentration einen geringen Rückgang der Expression nach 4h. Das Minimum dieser liegt nach Einsatz von 100 ng/ml rhBMP-2 vor. Gegensätzlich verhält sich die Expression nach 24h. Hierbei ist die Expression beim Einsatz niedrigerer Konzentrationen, wenn auch gering, vermindert, während sich das Expressionslevel nach Inkubation mit höheren Konzentrationen dem Ausgangswert annähert. Eine über den Ausgangswert hinausgehende Steigerung wird jedoch nicht erreicht (**Abb. 15B**).

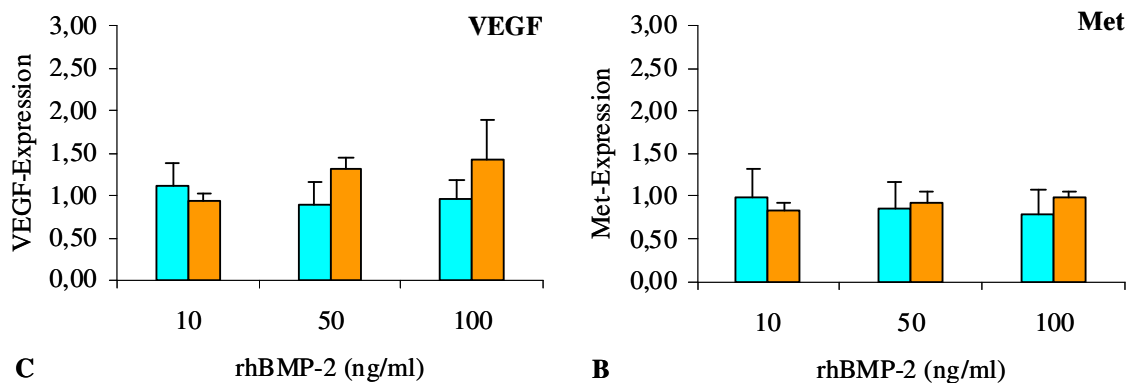


Abb. 15 Expressionslevel der Thrombin-Zielgene VEGF und Met bei der Zelllinie HepG2 im Inkubationsversuch mit rh-BMP-2.

Die Zellen wurden für 4h und 24h mit jeweils 10 ng/ml, 50 ng/ml und 100 ng/ml inkubiert. Aus den Zellen wurde die Gesamt-RNA isoliert und die cDNA synthetisiert. Die Genexpression der Thrombin-Zielgene wurde anschließend mittels realtime-PCR quantifiziert. Als interne Kontrolle diente das Housekeeping-Gen β -Aktin. Es wurden drei unabhängige Versuche in jeweiliger Doppelbestimmung durchgeführt (n=6). Die erhaltenen Transkriptmengen wurden auf β -Aktin abgeglichen und auf die Kontrolle (serumfreies Medium) bezogen. Die so erhaltenen Expressionslevel wurden anschließend gemittelt und grafisch dargestellt. Die Kontrolle nimmt hierbei den Wert 1 an. Hierbei erscheinen die 4h-Werte als hellblaue und die 24h-Werte als orange Balken. Abb. A stellt das Expressionslevel von VEGF dar, Abb. B zeigt das Expressionslevel von Met.

4.2.2.3 Zelllinie Sk-Hep1

Es wurden die Expressionslevel der BMP-Zielgene ID-1 und ID-2 sowie der Thrombin-Zielgene VEGF und Met nach Inkubation mit rhBMP-2 untersucht. Der Kontrollwert beträgt hierbei stets 1.

Wurde die Zelllinie Sk-Hep1 mit rhBMP-2 inkubiert, so bewirkt die Inkubation eine konzentrationsabhängige Steigerung der ID-1-Expression nach 4h. Während bei dem Einsatz einer niedrigen Konzentration von 10 ng/ml rhBMP-2 die Expression gering vermindert erscheint, so liegt nach dem Einsatz von 50 ng/ml rhBMP-2 fast eine Verdopplung der

Expression vor. Wurde die Konzentration des rhBMP-2 auf 100 ng/ml erhöht, so bewirkt dies sogar ein 7-fach gesteigertes Expressionslevel des BMP-Zielgens ID-1. Nach 24h hingegen ist dieser Effekt nicht mehr nachweisbar. (**Abb. 16A**). Das Level des BMP-Zielgens ID-2 bleibt durch die Einwirkung von rhBMP-2, bis auf eine um den Faktor 1,8 gesteigerte Expression 4h nach Inkubation mit 100 ng/ml rhBMP-2, nahezu unverändert (**Abb. 16B**). Demnach sind hierbei vor allem frühe Effekte von 100 ng/ml rhBMP-2 auf die Expression von ID-1 und ID-2 zu verzeichnen. Die Ergebnisse bei der Zelllinie Sk-Hep1 sind hierbei deutlich gegensätzlich zu den Ergebnissen bei den Zelllinien Hep3B und HepG2.

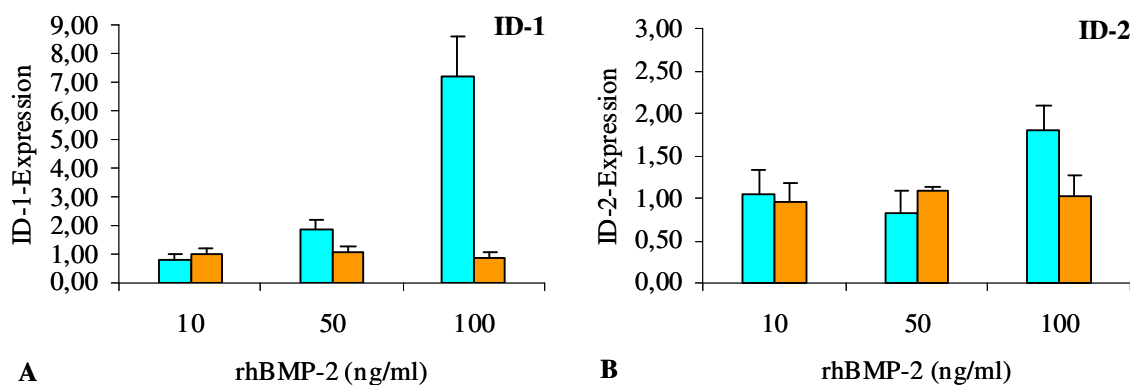


Abb. 16 Expressionslevel der BMP-Zielgene ID-1 und ID-2 bei der Zelllinie Sk-Hep1 im Inkubationsversuch mit rh-BMP-2.

Die Zellen wurden für 4h und 24h mit jeweils 10 ng/ml, 50 ng/ml und 100 ng/ml inkubiert. Aus den Zellen wurde die Gesamt-RNA isoliert und die cDNA synthetisiert. Die Genexpression der BMP-Zielgene wurde anschließend mittels realtime-PCR quantifiziert. Als interne Kontrolle diente das Housekeeping-Gen β -Aktin. Es wurden drei unabhängige Versuche in jeweiliger Doppelbestimmung durchgeführt (n=6). Die erhaltenen Transkriptmengen wurden auf β -Aktin abgeglichen und auf die Kontrolle (serumfreies Medium) bezogen. Die so erhaltenen Expressionslevel wurden anschließend gemittelt und grafisch dargestellt. Die Kontrolle nimmt hierbei den Wert 1 an. Hierbei erscheinen die 4h-Werte als hellblaue und die 24h-Werte als orange Balken. Abb. A stellt das Expressionslevel von ID-1 dar, Abb. B zeigt das Expressionslevel von ID-2.

Wird die Expression von VEGF bei der Zelllinie Sk-Hep1 betrachtet, so reagiert die Zelllinie nicht mit einer gesteigerten Genexpression auf zunehmende Konzentrationen an rhBMP-2. Bei allen Inkubationsbedingungen zeigt sich nach 4h eine gering verminderte und nach 24h eine nahezu gleichbleibende Expression des Gens VEGF (**Abb. 17A**).

Die Inkubation mit rhBMP-2 bewirkt bei Met, ebenso unabhängig von der eingesetzten Menge, keine Änderung des Expressionslevels (**Abb. 17B**).

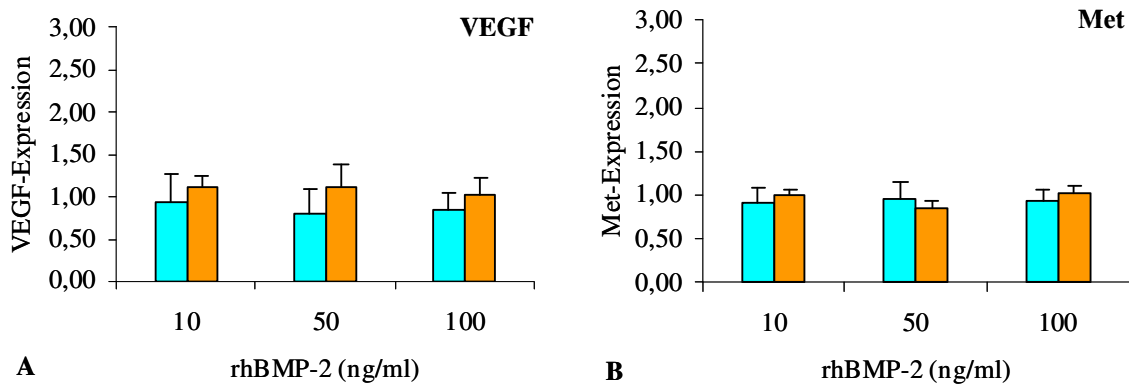


Abb. 17 Expressionslevel der Thrombin-Zielgene VEGF und Met bei der Zelllinie Sk-Hep1 im Inkubationsversuch mit rh-BMP-2.

Die Zellen wurden für 4h und 24h mit jeweils 10 ng/ml, 50 ng/ml und 100 ng/ml inkubiert. Aus den Zellen wurde die Gesamt-RNA isoliert und die cDNA synthetisiert. Die Genexpression der Thrombin-Zielgene wurde anschließend mittels realtime-PCR quantifiziert. Als interne Kontrolle diente das Housekeeping-Gen β -Aktin. Es wurden drei unabhängige Versuche in jeweiliger Doppelbestimmung durchgeführt (n=6). Die erhaltenen Transkriptmengen wurden auf β -Aktin abgeglichen und auf die Kontrolle (serumfreies Medium) bezogen. Die so erhaltenen Expressionslevel wurden anschließend gemittelt und grafisch dargestellt. Die Kontrolle nimmt hierbei den Wert 1 an. Hierbei erscheinen die 4h-Werte als hellblaue und die 24h-Werte als orange Balken. Abb. A stellt das Expressionslevel von VEGF dar, Abb. B zeigt das Expressionslevel von Met.

4.2.3 Einfluss von Thrombin auf Zielgene des Thrombin-Systems und des BMP-Systems

Um die Wirkung von Thrombin auf Zielgene des eigenen Systems aber auch auf Zielgene des BMP-Systems genauer zu analysieren, wurden weitere Inkubationsversuche mit Thrombin als natürlichen PAR-Rezeptor-Agonisten durchgeführt. Die Untersuchungen wurden bei den drei humanen HCC-Zelllinien Hep3B, HepG2 und Sk-Hep1 durchgeführt. Die Änderungen der Expression der Thrombin-Zielgene VEGF und Met und der BMP-Zielgene ID-1 und ID-2 wurden mittels realtime-PCR quantifiziert. Die Zellen wurden für 4h und 24h mit jeweils 0,01 NIH-U/ml, 0,10 NIH-U/ml und 1,0 NIH-U/ml inkubiert. Aus den Zellen wurde die Gesamt-RNA isoliert und die cDNA synthetisiert. Die Genexpression wurde anschließend mittels realtime-PCR quantifiziert. Als interne Kontrolle diente das Housekeeping-Gen β -Aktin. Es wurden drei unabhängige Versuche in jeweiliger Doppelbestimmung durchgeführt (n=6). Die erhaltenen Transkriptmengen wurden auf β -Aktin abgeglichen und auf die Kontrolle (serumfreies Medium) bezogen. Die so erhaltenen Expressionslevel wurden anschließend gemittelt und grafisch dargestellt. Die Kontrolle nimmt hierbei stets den Wert 1 an. Beträgt der Expressionslevel der einzelnen Gene nach Inkubation $< 0,5$ oder $> 2,5$, so wird von einer starken Regulation ausgegangen.

4.2.3.1 Zelllinie Hep3B

Es wurden die Expressionslevel der Thrombin-Zielgene VEGF und Met sowie der BMP-Zielgene ID-1 und ID-2 nach Inkubation mit Thrombin untersucht. Der Kontrollwert beträgt hierbei stets 1.

Bei der Betrachtung der Expression des Thrombin-Zielgens VEGF kann man einen konzentrationsabhängigen Effekt des Thrombins nach 24h annehmen. Die Expression ist hierbei bei dem Einsatz einer niedrigen Thrombinkonzentration von 0,01 NIH-U/ml gegenüber den anderen Inkubationsansätzen um den Faktor 1,7 erhöht. Höhere Konzentrationen bewirken im Gegensatz dazu keine weitere Steigerung des Expressionslevels. Beträgt die Inkubationszeit allerdings nur 4h, so ist, jedoch unabhängig von der Thrombinkonzentration, ein Rückgang der VEGF-Expression zu verzeichnen. Das Minimum, eine Senkung des VEGF-Levels auf 0,44, wird durch den Einsatz von 0,10 NIH-U/ml erreicht (**Abb. 18A**).

Die Hep3B-Zellen reagieren nur minimal mit einer veränderten Met-Expression auf die Inkubation mit Thrombin. Bis auf eine gering erhöhte Expression von Met 24h nach Inkubation mit 0,01 NIH-U/ml und 1,00 NIH-U/ml, nimmt die Expression des Gens unter den anderen Inkubationsbedingungen auf ähnliche Weise, verglichen mit dem Ausgangsniveau, ab (**Abb. 18B**).

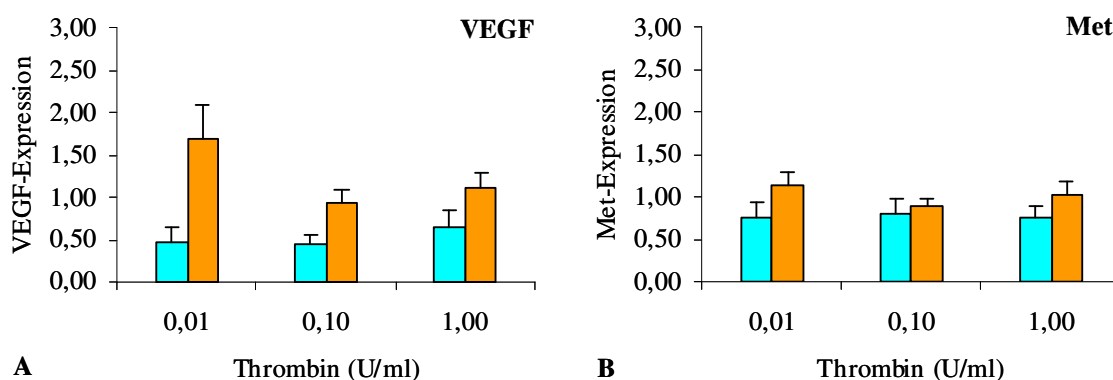


Abb. 18 Expressionslevel der Thrombin-Zielgene VEGF und Met bei der Zelllinie Hep3B im Inkubationsversuch mit Thrombin.

Die Zellen wurden für 4h und 24h mit jeweils 0,01 NIH-U/ml, 0,10 NIH-U/ml und 1,0 NIH-U/ml NIH-U/ml Thrombin inkubiert. Aus den Zellen wurde die Gesamt-RNA isoliert und die cDNA synthetisiert. Die Genexpression der Thrombin-Zielgene wurde anschließend mittels realtime-PCR quantifiziert. Als interne Kontrolle diente das Housekeeping-Gen β -Aktin. Es wurden drei unabhängige Versuche in jeweiliger Doppelbestimmung durchgeführt (n=6). Die erhaltenen Transkriptmengen wurden auf β -Aktin abgeglichen und auf die Kontrolle (serumfreies Medium) bezogen. Die so erhaltenen Expressionslevel wurden anschließend gemittelt und grafisch dargestellt. Die Kontrolle nimmt hierbei den Wert 1 an. Hierbei erscheinen die 4h-Werte als hellblaue und die 24h-Werte als orange Balken. Abb. A stellt das Expressionslevel von VEGF dar, Abb. B zeigt das Expressionslevel von Met.

Die Inkubation mit Thrombin lässt die Expression des BMP-Zielgens ID-1 unbeeinflusst (**Abb. 19A**).

Bei ID-2 ergeben sich Veränderungen der Genexpression, die mit denen von VEGF nach Inkubation von Thrombin (**Abb. 18A**) vergleichbar sind. Thrombin führt, unabhängig von der eingesetzten Konzentration, nach 4h Inkubationszeit etwa zu einer Halbierung des ID-2-Levels. Ebenso wie bei VEGF kann man einen konzentrationsabhängigen Effekt des Thrombins nach 24h annehmen. Es kommt hier in allen Fällen zu einem Anstieg der Expressionslevel. Das Maximum, eine um 1,63-fach gesteigerte Expression, liegt nach Inkubation mit der niedrigsten Thrombinkonzentration von 0,01 NIH-U/ml vor (**Abb. 19B**).

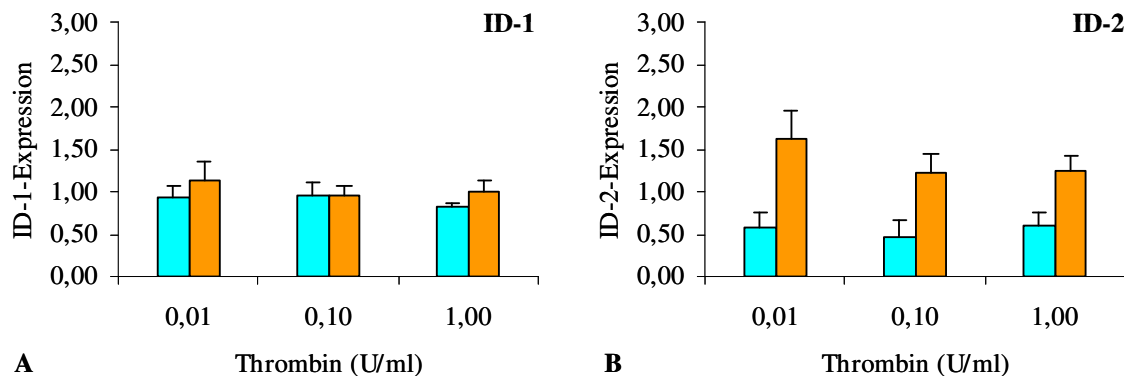


Abb. 19 Expressionslevel der BMP-Zielgene ID-1 und ID-2 bei der Zelllinie Hep3B im Inkubationsversuch mit Thrombin.

Die Zellen wurden für 4h und 24h mit jeweils 0,01 NIH-U/ml, 0,10 NIH-U/ml und 1,0 NIH-U/ml Thrombin inkubiert. Aus den Zellen wurde die Gesamt-RNA isoliert und die cDNA synthetisiert. Die Genexpression der BMP-Zielgene wurde anschließend mittels realtime-PCR quantifiziert. Als interne Kontrolle diente das Housekeeping-Gen β -Aktin. Es wurden drei unabhängige Versuche in jeweiliger Doppelbestimmung durchgeführt (n=6). Die erhaltenen Transkriptmengen wurden auf β -Aktin abgeglichen und auf die Kontrolle (serumfreies Medium) bezogen. Die so erhaltenen Expressionslevel wurden anschließend gemittelt und grafisch dargestellt. Die Kontrolle nimmt hierbei den Wert 1 an. Hierbei erscheinen die 4h-Werte als hellblaue und die 24h-Werte als orange Balken. Abb. A stellt das Expressionslevel von ID-1 dar, Abb. B zeigt das Expressionslevel von ID-2.

4.2.3.2 Zelllinie HepG2

Es wurden die Expressionslevel der Thrombin-Zielgene VEGF und Met sowie der BMP-Zielgene ID-1 und ID-2 nach Inkubation mit Thrombin untersucht. Der Kontrollwert beträgt hierbei stets 1.

Betrachtet man das VEGF-Level nach Inkubation der Zelllinie HepG2 mit Thrombin, so ist die Expression nach 4h Inkubationszeit stets geringer als nach 24h Inkubationszeit. Mit steigender Thrombinkonzentration kommt es weder zu einer, mit der eingesetzten Konzentration korrelierenden Zunahme noch Abnahme des Expressionslevels. Unabhängig von der Thrombinkonzentration ist die VEGF-Expression 4h nach Inkubation gegenüber dem

Ausgangsniveau erniedrigt. Eine auf etwa 0,6-fach gesunkene Expression liegt hierbei nach Einsatz von 0,10 NIH-U/ml Thrombin vor. 24h nach Inkubation wird VEGF stets geringfügig höher exprimiert. Ein um den maximalen Faktor 1,5 gesteigertes VEGF-Level liegt nach Inkubation mit 0,01 NIH-U/ml Thrombin, als niedrigste eingesetzte Konzentration, vor (**Abb. 20A**).

Bei Met ist kein konzentrationsabhängiger Effekt von Thrombin zu verzeichnen. Bis auf eine leicht verminderte Expression 4h nach Inkubation mit 0,01 NIH-U/ml und 0,10 NIH-U/ml gegenüber dem Ausgangsniveau, liegt das Met-Expressionslevel durch Thrombin nahezu unverändert vor (**Abb. 20B**).

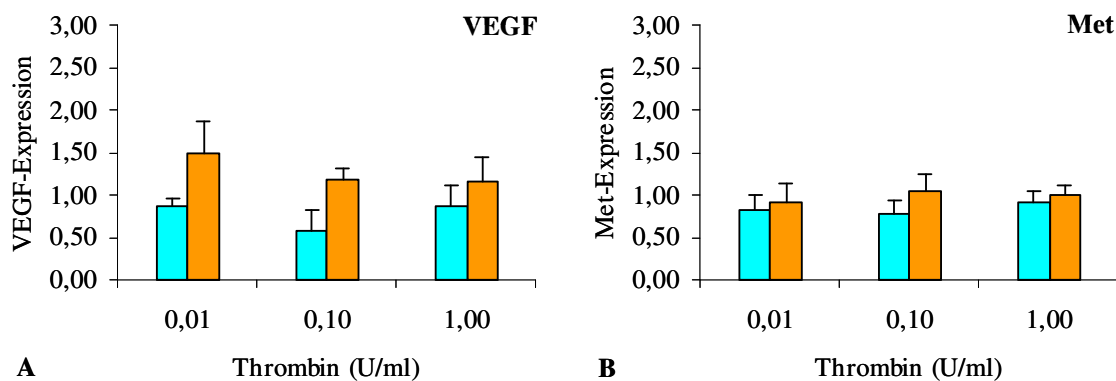


Abb. 20 Expressionslevel der Thrombin-Zielgene VEGF und Met bei der Zelllinie HepG2 im Inkubationsversuch mit Thrombin.

Die Zellen wurden für 4h und 24h mit jeweils 0,01 NIH-U/ml, 0,10 NIH-U/ml und 1,0 NIH-U/ml Thrombin inkubiert. Aus den Zellen wurde die Gesamt-RNA isoliert und die cDNA synthetisiert. Die Genexpression der Thrombin-Zielgene wurde anschließend mittels realtime-PCR quantifiziert. Als interne Kontrolle diente das Housekeeping-Gen β -Aktin. Es wurden drei unabhängige Versuche in jeweiliger Doppelbestimmung durchgeführt (n=6). Die erhaltenen Transkriptmengen wurden auf β -Aktin abgeglichen und auf die Kontrolle (serumfreies Medium) bezogen. Die so erhaltenen Expressionslevel wurden anschließend gemittelt und grafisch dargestellt. Die Kontrolle nimmt hierbei den Wert 1 an. Hierbei erscheinen die 4h-Werte als hellblaue und die 24h-Werte als orange Balken. Abb. A stellt das Expressionslevel von VEGF dar, Abb. B zeigt das Expressionslevel von Met.

Bei der Expression von ID-1 lässt sich bei der Zelllinie HepG2 nach Inkubation mit Thrombin ein gering konzentrationsabhängiger Effekt vermuten. Die 4h-Werte nehmen mit steigender Konzentration gering ab und liegen hierbei stets unter dem Ausgangsniveau des Expressionslevels. Betrachtet man das 24 h-Expressionslevel, so ist dieses nach Inkubation mit der niedrigsten Thrombinkonzentration von 0,01 NIH-U/ml 1,3-fach erhöht, nähert sich aber nach Inkubation mit höheren Konzentrationen wieder dem Ursprungslevel an (**Abb. 21A**).

Ähnlich verhält es sich mit dem BMP-Zielgen ID-2. Die Expression ist nach 4h stets erniedrigt. Dabei ist der Rückgang des Expressionslevels nach Inkubation mit 0,01 NIH-U/ml und 1,00 NIH-U/ml ähnlich. Verglichen mit diesem bewirken 0,10 NIH-U/ml Thrombin mit

einer Halbierung der Expression den stärksten Effekt. Vergleichbar mit dem ID-1-Level ist das Expressionsniveau nach 24h. Dieses ist nach Inkubation mit der niedrigsten Thrombinkonzentration von 0,01 NIH-U/ml 1,5-fach erhöht, nähert sich aber bei ID-2 nach Inkubation mit höheren Konzentrationen wieder dem Ausgangswert an (**Abb. 21B**).

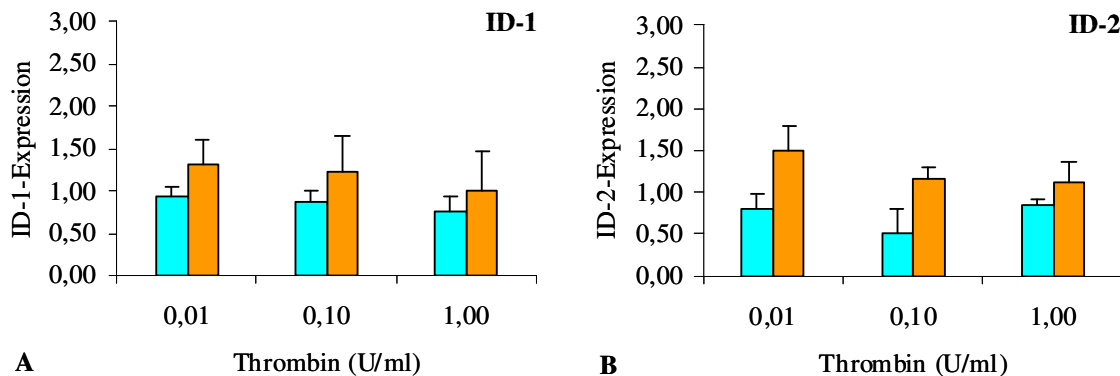


Abb. 21 Expressionslevel der BMP-Zielgene ID-1 und ID-2 bei der Zelllinie HepG2 im Inkubationsversuch mit Thrombin.

Die Zellen wurden für 4h und 24h mit jeweils 0,01 NIH-U/ml, 0,10 NIH-U/ml und 1,0 NIH-U/ml Thrombin inkubiert. Aus den Zellen wurde die Gesamt-RNA isoliert und die cDNA synthetisiert. Die Genexpression der BMP-Zielgene wurde anschließend mittels realtime-PCR quantifiziert. Als interne Kontrolle diente das Housekeeping-Gen β -Aktin. Es wurden drei unabhängige Versuche in jeweiliger Doppelbestimmung durchgeführt (n=6). Die erhaltenen Transkriptmengen wurden auf β -Aktin abgeglichen und auf die Kontrolle (serumfreies Medium) bezogen. Die so erhaltenen Expressionslevel wurden anschließend gemittelt und grafisch dargestellt. Die Kontrolle nimmt hierbei den Wert 1 an. Hierbei erscheinen die 4h-Werte als hellblaue und die 24h-Werte als orange Balken. Abb. A stellt das Expressionslevel von ID-1 dar, Abb. B zeigt das Expressionslevel von ID-2.

4.2.3.3 Zelllinie Sk-Hep1

Es wurden die Expressionslevel der Thrombin-Zielgene VEGF und Met sowie der BMP-Zielgene ID-1 und ID-2 nach Inkubation mit Thrombin untersucht. Der Kontrollwert beträgt hierbei stets 1.

Wurde die Zelllinie Sk-Hep1 mit 0,01 NIH-U/ml und 1,00 NIH-U/ml Thrombin inkubiert, so ist das Expressionslevel von VEGF vergleichbar. Dieses nimmt in beiden Fällen 4h nach Inkubation auf das 0,8-fache des Ausgangsniveaus ab und 24h nach Inkubation auf das 1,3-fache bis 1,4-fache zu. Nach Einfluss von 0,10 NIH-U/ml Thrombin ist eine auf das 0,7-fach gesunkene Expression zu verzeichnen. Dieses stellt das Minimum der Expression dar. Der 24h-Wert bleibt unbeeinflusst (**Abb. 22A**).

Die Expression von Met bleibt trotz Einwirkung von Thrombin, bis auf eine geringe Abnahme 4h nach Inkubation mit 1,00 NIH-U/ml, nahezu unverändert (**Abb. 22B**).

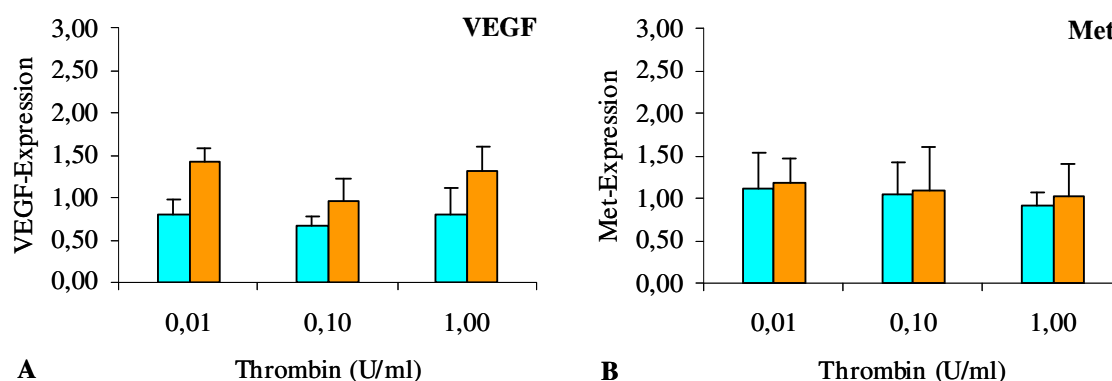


Abb. 22 Expressionslevel der Thrombin-Zielgene VEGF und Met bei der Zelllinie Sk-Hep1 im Inkubationsversuch mit Thrombin.

Die Zellen wurden für 4h und 24h mit jeweils 0,01 NIH-U/ml, 0,10 NIH-U/ml und 1,0 NIH-U/ml Thrombin inkubiert. Aus den Zellen wurde die Gesamt-RNA isoliert und die cDNA synthetisiert. Die Genexpression der Thrombin-Zielgene wurde anschließend mittels realtime-PCR quantifiziert. Als interne Kontrolle diente das Housekeeping-Gen β -Aktin. Es wurden drei unabhängige Versuche in jeweiliger Doppelbestimmung durchgeführt (n=6). Die erhaltenen Transkriptmengen wurden auf β -Aktin abgeglichen und auf die Kontrolle (serumfreies Medium) bezogen. Die so erhaltenen Expressionslevel wurden anschließend gemittelt und grafisch dargestellt. Die Kontrolle nimmt hierbei den Wert 1 an. Hierbei erscheinen die 4h-Werte als hellblaue und die 24h-Werte als orange Balken. Abb. A stellt das Expressionslevel von VEGF dar, Abb. B zeigt das Expressionslevel von Met.

Bei dem BMP-Zielgen ID-1 bewirkt Thrombin, unabhängig von der eingesetzten Konzentration, nahezu keine Änderungen der Expression (**Abb. 23A**).

Betrachtet man die Expression von ID-2, so ist diese 4h nach Inkubation mit Thrombin bei allen Ansätzen bis auf ein Minimum von 0,6 des Ausgangslevels erniedrigt. Ein maximaler Anstieg der Expression um etwa den Faktor 1,44 ist 24h nach Inkubation mit 0,01 NIH-U/ml Thrombin zu verzeichnen. Höhere Thrombinkonzentrationen führen nicht zu diesem Effekt und bewirken annähernd keine Änderung des Expressionslevels (**Abb. 23B**).

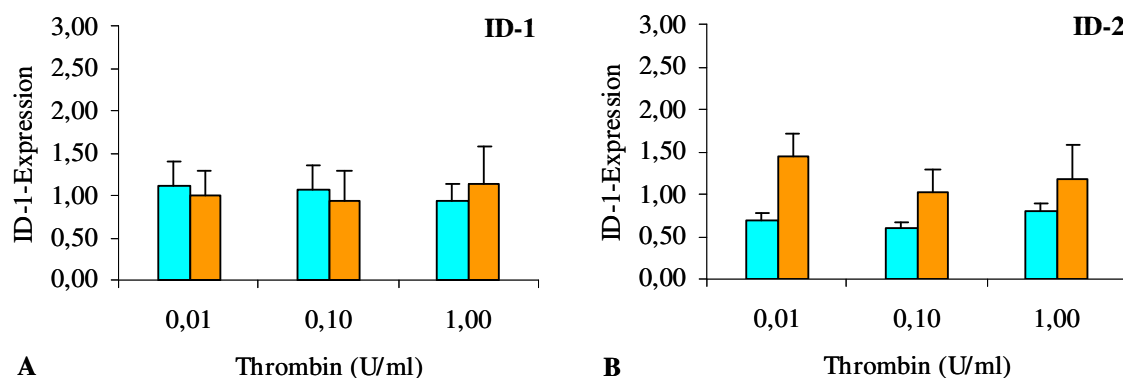


Abb. 23 Expressionslevel der BMP-Zielgene ID-1 und ID-2 bei der Zelllinie Sk-Hep1 im Inkubationsversuch mit Thrombin.

Die Zellen wurden für 4h und 24h mit jeweils 0,01 NIH-U/ml, 0,10 NIH-U/ml und 1,0 NIH-U/ml Thrombin inkubiert. Aus den Zellen wurde die Gesamt-RNA isoliert und die cDNA synthetisiert. Die Genexpression der BMP-Zielgene wurde anschließend mittels realtime-PCR quantifiziert. Als interne Kontrolle diente das Housekeeping-Gen β -Aktin. Es wurden drei unabhängige Versuche in jeweiliger Doppelbestimmung durchgeführt (n=6). Die erhaltenen Transkriptmengen wurden auf β -Aktin abgeglichen und auf die Kontrolle (serumfreies Medium) bezogen. Die so erhaltenen Expressionslevel wurden anschließend gemittelt und grafisch dargestellt. Die Kontrolle nimmt hierbei den Wert 1 an. Hierbei erscheinen die 4h-Werte als hellblaue und die 24h-Werte als orange Balken. Abb. A stellt das Expressionslevel von ID-1 dar, Abb. B zeigt das Expressionslevel von ID-2.

4.3 Untersuchung der Interaktionen des BMP-Systems und des Thrombin-/PAR-Systems auf Aktivitätsebene mittels Migrationsversuchen

Für eine genauere Analyse der Interaktionen des BMP-Systems und des Thrombin-/PAR-Systems wurde die Migration als ein komplexer, tumorbiologisch bedeutsamer Prozess anhand eines in-vitro Modells untersucht. In anderen Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass sowohl BMP- als auch PAR-vermittelte Signale die Migration von Tumorzellen beeinflussen. Der Einfluss von Thrombin, von PAR-Subtyp-selektiven Agonisten, rhBMP-2, BMP-Inhibitoren, BMP-Rezeptor-Inhibitoren oder deren Kombination auf die Migration von Hep3B-Zellen wurde in einem Transwell-Kammer-System untersucht.

Die Migrations-Assays wurden mittels einer 48-Well Boyden Chamber von NeuroProbe durchgeführt. Die Zellen wurden serumfrei gehalten (nur RPMI 1640) und, je nach Versuchsansatz, unter Zugabe möglicher migrationsmodifizierender Substanzen in die obere Kammer gegeben. Verschiedene chemoattraktive Substanzen wurden in die untere Kammer gegeben. Die Zellen wanderten entlang eines Konzentrationsgradienten durch eine kollagenbeschichtete Polycarbonatmembran. Nach 24h wurden die migrierten Zellen fixiert, gefärbt und mikroskopisch gezählt. Pro Migrations-Assay wurden die Versuchsansätze 8-fach durchgeführt (n=8). Die Werte wurden gemittelt und grafisch dargestellt. Die Kontrolle

beinhaltet nur RPMI 1640. Die folgenden dargestellten Experimente sind jeweils repräsentativ für zwei unabhängige Assays.

4.3.1 Einfluss von Thrombin und von PAR-Agonisten auf die Migration von Hep3B-Zellen

Es wurde der Einfluss von Thrombin, eines PAR₁-Agonisten und eines PAR₄-Agonisten auf die Migration von Hep3B-Zellen mittels einer Boyden Chamber untersucht. Die zuvor serumfrei gehaltenen Zellen wurden in die obere Kammer und die chemoattraktiven Substanzen wurden in die untere Kammer gegeben. Die **Abb. 24** zeigt, dass sowohl Thrombin als auch die PAR-Agonisten chemoattraktiv auf Hep3B-Zellen wirken.

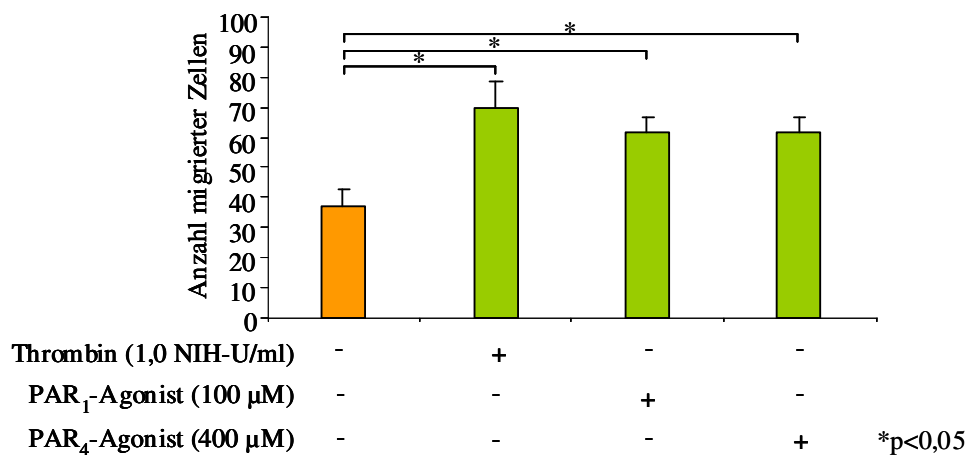


Abb. 24 Steigerung der Migration von Hep3B-Zellen durch Thrombin und durch PAR-Agonisten.

Das Migrations-Assay wurde mittels einer 48-Well Boyden Chamber von NeuroProbe durchgeführt. Die Zellen wurden serumfrei gehalten (nur RPMI 1640) und in die obere Kammer gegeben. Thrombin (1,0 NIH-U/ml), ein PAR₁-Agonist (100 µM) oder ein PAR₄-Agonist (400 µM) wurden je nach Versuchsansatz in die untere Kammer gegeben. Die Zellen wanderten entlang des durch die Substanzen ausgebildeten Konzentrationsgradienten durch eine Polycarbonatmembran. Nach 24h wurden die migrierten Zellen fixiert, gefärbt und mikroskopisch gezählt. Die Abbildung zeigt die Anzahl migrierter Zellen bei verschiedenen Versuchsansätzen. Die Versuchsansätze wurden 8-fach durchgeführt (n=8). Die Werte wurden gemittelt und grafisch dargestellt. Die Kontrolle beinhaltet nur RPMI 1640. Das Experiment ist repräsentativ für zwei unabhängige Assays. Die statistische Auswertung erfolgte durch den Mann-Whitney-Test. *p<0,05 gilt als statistisch signifikant.

Sowohl Thrombin als auch der PAR₁-Agonist und der PAR₄-Agonist führten zu einem signifikanten Anstieg der Anzahl migrierter Zellen verglichen zur Kontrolle, die nur serumfreies Medium (RPMI 1640) enthält.

Thrombin führt mit etwa einer Verdopplung der Anzahl migrierter Zellen zu einem stärksten Anstieg der Migration. Etwas geringer, aber dennoch statistisch signifikant im Vergleich zur Kontrolle, fiel der Einfluss der PAR-Agonisten auf die Migration der Hep3B-Zellen aus. Die

Effekte des PAR₁-Agonisten und des PAR₄-Agonisten sind hierbei vergleichbar. Trotz des stärkeren Einflusses von Thrombin auf die Migration der Zellen im Vergleich zu den PAR-Agonisten ergeben sich keine signifikanten Unterschiede zur der durch die PARs stimulierten Migration.

4.3.2 Einfluss von rhBMP-2 auf die Migration von Hep3B-Zellen

Um den Einfluss des BMP-Systems auf Aktivitätsebene bzw. im biologischen System genauer zu analysieren, wurde in einem weiteren Migrationsversuch rhBMP-2 in verschiedenen Konzentrationen (10, 50 und 100 ng/ml) als mögliches chemoattraktives Agens eingesetzt. Die Substanz wurde in das untere Kompartiment gegeben. Die Ergebnisse des Versuches sind in **Abb. 25** dargestellt.

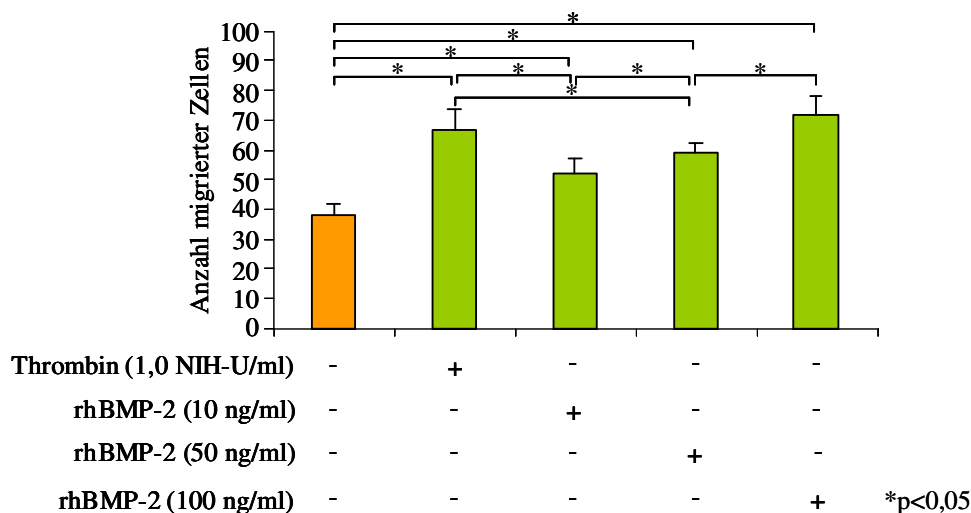


Abb. 25 Steigerung der Migration von Hep3B-Zellen durch rhBMP-2.

Das Migrations-Assay wurde mittels einer 48-Well Boyden Chamber von NeuroProbe durchgeführt. Die Zellen wurden serumfrei gehalten (nur RPMI 1640) und in die obere Kammer gegeben. Thrombin (1,0 NIH-U/ml) oder unterschiedliche Konzentrationen von rhBMP-2 (10, 50, 100 ng/ml) wurden je nach Versuchsansatz in die untere Kammer gegeben. Die Zellen wanderten durch eine Polycarbonatmembran. Nach 24h wurden die migrierten Zellen fixiert, gefärbt und mikroskopisch gezählt. Die Abbildung zeigt die Anzahl migrierter Zellen bei verschiedenen Versuchsansätzen. Die Versuchsansätze wurden 8-fach durchgeführt (n=8). Die Werte wurden gemittelt und grafisch dargestellt. Die Kontrolle beinhaltet nur RPMI 1640. Das Experiment ist repräsentativ für zwei unabhängige Assays. Die statistische Auswertung erfolgte durch den Mann-Whitney-Test. *p<0,05 gilt als statistisch signifikant.

Die Einwirkung von rhBMP-2 bewirkt eine konzentrationsabhängige Steigerung der Migration von Hep3B-Zellen durch eine Polycarbonatmembran nach 24h. Schon durch den Einsatz niedriger Konzentrationen von rhBMP-2 ist ein signifikanter Anstieg der Anzahl migrierter Zellen, verglichen mit der Kontrolle, zu verzeichnen. Auch nach dem Einsatz

höheren Konzentrationen bis 100 ng/ml rhBMP-2 ist die Migration signifikant gesteigert. Vergleicht man die durch unterschiedliche Konzentrationen von rhBMP-2 erhöhten Migrationsraten untereinander, so unterscheiden auch diese sich signifikant. Dementsprechend nimmt die Migration nach Einwirkung von 50 ng/ml rhBMP-2 verglichen mit der Migration nach Einwirkung von 10 ng/ml rhBMP-2 signifikant zu. Gleichermaßen bewirken 100 ng/ml rhBMP-2 eine weitere, ebenfalls signifikant gesteigerte Migration verglichen mit 50 ng/ml. Der **Abb. 25** ist ebenfalls zu entnehmen, dass Thrombin, welches zum Vergleich wiederholt eingesetzt wurde, zu einer signifikant höheren Migrationsrate führt als 10 ng/ml und 50 ng/ml rhBMP-2. Dabei ist die durch Thrombin induzierte Migrationssteigerung von Hep3B-Zellen mit der Wirkung von 100 ng/ml rhBMP-2 vergleichbar.

4.3.3 Einfluss von Thrombin und des PAR₁-Agonisten in Kombination mit rhBMP-2 auf die Migration von Hep3B-Zellen

Die stimulierende Wirkung von Thrombin, der PAR-Agonisten und von rhBMP-2 auf die Migration von Hep3B-Zellen konnte in vorherigen Versuchen bereits bewiesen werden. In einem weiteren Versuch wurden die Substanzen daher kombiniert eingesetzt, um eventuelle additive Effekte auf die Zellmigration zu analysieren. Da 100 ng/ml rhBMP-2 in gleicher Weise wie Thrombin die Migration steigern, wurde diese Konzentration in Kombination mit Thrombin und mit dem PAR₁-Agonisten eingesetzt. Die Ergebnisse des Experimentes, das wiederum repräsentativ für zwei unabhängige Assays ist, sind der **Abb. 26** zu entnehmen.

In diesem Versuch konnte wiederholt dargestellt werden, dass sowohl 1,0 NIH-U/ml Thrombin und 100 µM des PAR₁-Agonisten als auch 100 ng/ml rhBMP-2 in gleichem Maße die Migration auf das 1,5-fache des Ausgangsniveaus signifikant steigern.

Ein kombinierter Einsatz von Thrombin und rhBMP-2 führt allerdings nur zu einer minimalen, jedoch nicht signifikanten, weiteren Zunahme der Migration von Hep3B-Zellen nach 24h. Somit ergeben sich keine additiven Effekte. Ebenso wird die Migration durch die kombinierte Gabe des PAR₁-Agonisten und von rhBMP-2 nicht weiter gesteigert.

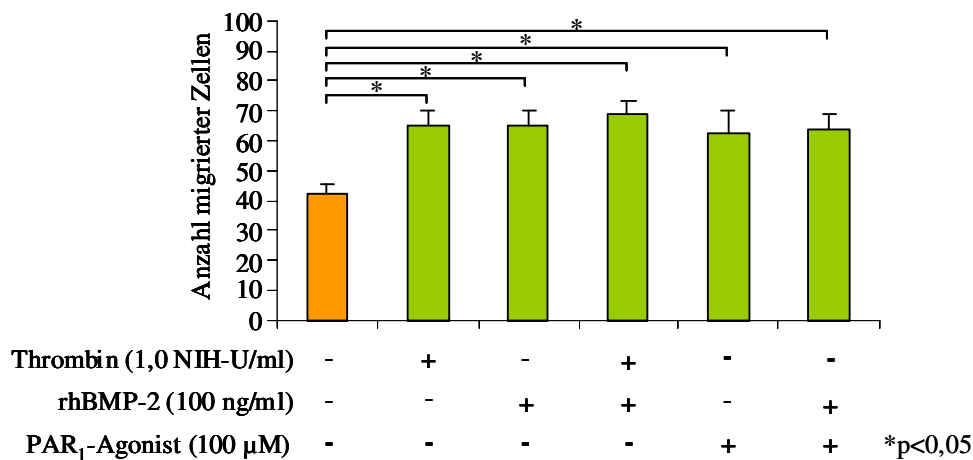


Abb. 26 Keine Verstärkung der durch Thrombin und durch den PAR₁-Agonisten gesteigerten Migration von Hep3B-Zellen in Kombination mit rhBMP-2.

Das Migrations-Assay wurde mittels einer 48-Well Boyden Chamber von NeuroProbe durchgeführt. Die Zellen wurden serumfrei gehalten (nur RPMI 1640) und in die obere Kammer gegeben. Thrombin (1,0 NIH-U/ml), rhBMP-2 (100 ng/ml) oder ein PAR₁-Agonist (100 µM), alleine oder in Kombination, wurden je nach Versuchsansatz in die untere Kammer gegeben. Die Zellen wanderten durch eine Polycarbonatmembran. Nach 24h wurden die migrierten Zellen fixiert, gefärbt und mikroskopisch gezählt. Die Abbildung zeigt die Anzahl migrierter Zellen bei verschiedenen Versuchsansätzen. Die Versuchsansätze wurden 8-fach durchgeführt (n=8). Die Werte wurden gemittelt und grafisch dargestellt. Die Kontrolle beinhaltet nur RPMI 1640. Das Experiment ist repräsentativ für zwei unabhängige Assays. Die statistische Auswertung erfolgte durch den Mann-Whitney-Test. *p<0,05 gilt als statistisch signifikant.

4.3.4 Einfluss von rhNoggin und rhALK3 auf die durch Thrombin stimulierte Migration von Hep3B-Zellen

In einem weiteren Migrationsversuch wurde anschließend analysiert, ob die durch Thrombin stimulierte Migration bei Hep3B-Zellen durch Komponenten des BMP-Systems beeinflusst werden kann. Dabei kam es zum Einsatz von rhNoggin, einem unspezifischen BMP-Inhibitor, und rhALK3, der löslichen extrazellulären Domäne des Typ-1-BMP-Rezeptors. Diese migrationsmodifizierenden Substanzen wurden, je nach Versuchsansatz, zusammen mit den Zellen in das obere Kompartiment der Boyden Chamber gegeben. Thrombin, das chemoattraktiv wirkt, wurde in das untere Kompartiment gegeben. Die Ergebnisse des Experimentes sind in **Abb. 27** dargestellt. Rot hervorgehoben sind hierbei Ergebnisse von besonderem Interesse.

Wurde nur Thrombin in einem Versuchsansatz eingesetzt, so zeigt sich, wie bereits in vorangegangenen Versuchen, eine Steigerung der Migration von Hep3B-Zellen. Ebenso ist nach dem Einsatz von rhNoggin eine signifikante Zunahme der Anzahl migrierter Zellen im Vergleich zur Kontrolle zu verzeichnen. Verglichen mit der Wirkung von Thrombin, fällt der Effekt von rhNoggin auf die Migration jedoch signifikant geringer aus. Bei einem

kombinierten Einsatz von Thrombin und rhNoggin ist die Anzahl migrierter Zellen mit der Kontrolle vergleichbar. Auffällig ist hierbei jedoch, dass durch den kombinierten Einsatz der Substanzen der Thrombineffekt gehemmt wird. Die Kombination bewirkt eine signifikante Abnahme der durch Thrombin stimulierten Migration auf etwas das Ausgangsniveau.

Wurde bei dem Migrationsversuch rhALK3 eingesetzt, so wanderten bei diesem Versuchsansatz, verglichen zur Kontrolle, auch hierbei signifikant mehr Hep3B-Zellen durch die Membran. Somit steigert rhALK3 etwa im Maße von rhNoggin signifikant die Migration. Diese Wirkung fällt, verglichen mit der von Thrombin, jedoch geringer aus. Bei einem kombinierten Versuchsansatz von Thrombin und rhALK3 ist ein weiterer Anstieg der Anzahl migrierter Zellen zu dokumentieren. Die Zunahme der Migration durch Kombination von rhALK3 und Thrombin ist im Vergleich zur rhALK3-Wirkung ebenso signifikant und mit der alleinigen Thrombinwirkung vergleichbar. Wenn man abschließend die kombinierte Wirkung von Thrombin und rhNoggin mit der kombinierten Wirkung von Thrombin und rhALK3 vergleicht, so sind unterschiedliche Effekte zu dokumentieren. Während unter gleichzeitiger Einwirkung von Thrombin und rhNoggin der Thrombineffekt gehemmt wird, bleibt dieser unter Einfluss von rhALK3 unbeeinflusst.

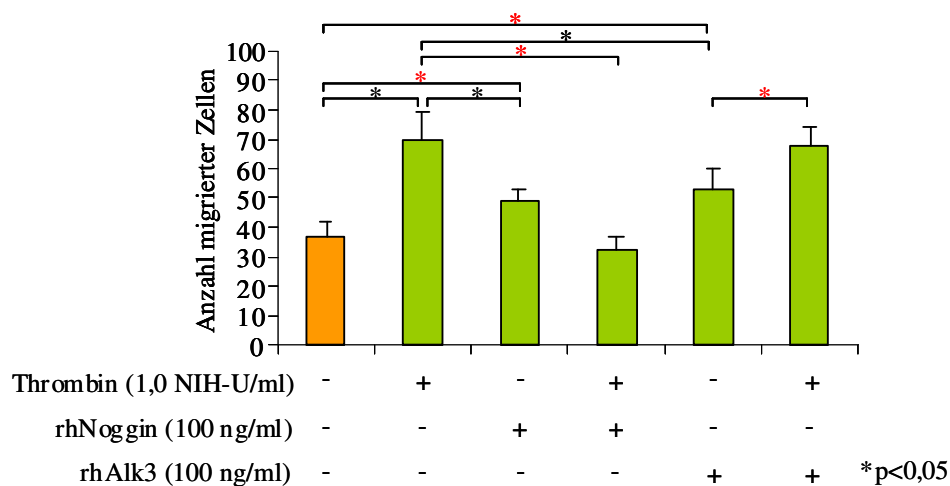


Abb. 27 Beeinflussung der durch Thrombin stimulierten Migration von Hep3B-Zellen durch rhNoggin und rhALK3.

Das Migrations-Assay wurde mittels einer 48-Well Boyden Chamber von NeuroProbe durchgeführt. Die Zellen wurden serumfrei gehalten (nur RPMI 1640) und unter Zugabe der migrationsmodifizierenden Substanzen rhNoggin (100 ng/ml) oder rhALK3 (100 ng/ml) in die obere Kammer gegeben. Thrombin (1,0 NIH-U/ml) wurden je nach Versuchsansatz in die untere Kammer gegeben. Die Zellen wanderten durch eine Polycarbonatmembran. Nach 24h wurden die migrierten Zellen fixiert, gefärbt und mikroskopisch gezählt. Die Abbildung zeigt die Anzahl migrierter Zellen bei verschiedenen Versuchsansätzen. Die Versuchsansätze wurden 8-fach durchgeführt (n=8). Die Werte wurden gemittelt und grafisch dargestellt. Die Kontrolle beinhaltet nur RPMI 1640. Das Experiment ist repräsentativ für zwei unabhängige Assays. Die statistische Auswertung erfolgte durch den Mann-Whitney-Test. *p<0,05 gilt als statistisch signifikant. Ergebnisse von besonderem Interesse sind rot markiert.

4.3.5 Einfluss von rhNoggin auf die durch die PAR-Agonisten stimulierte Migration von Hep3B-Zellen

In vorherigen Versuchen konnte gezeigt werden, dass sowohl Thrombin als auch die PAR-Agonisten migrationssteigernd wirken (**Abb. 24**). Der Thrombineffekt wird durch den gleichzeitigen Einsatz von rhNoggin gehemmt (**Abb. 27**).

In einem weiteren Migrationsversuch wurde nun analysiert, ob rhNoggin auch die durch den PAR₁-Agonisten und den PAR₄-Agonisten gesteigerte Migration herabsetzen kann.

In die obere Kammer wurde rhNoggin und in die untere Kammer wurde, je nach Versuchsansatz, ein PAR₁-Agonist oder ein PAR₄-Agonist gegeben. Die Ergebnisse sind in **Abb. 28** dargestellt.

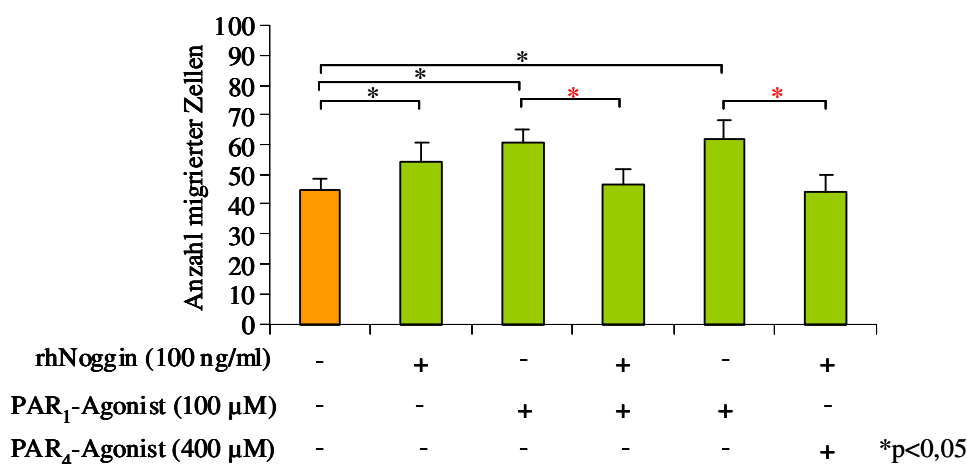


Abb. 28 Hemmung der durch die PAR-Agonisten stimulierten Migration von Hep3B-Zellen durch rhNoggin. Das Migrations-Assay wurde mittels einer 48-Well Boyden Chamber von NeuroProbe durchgeführt. Die Zellen wurden serumfrei gehalten (nur RPMI 1640) und unter Zugabe der migrationsmodifizierenden Substanz rhNoggin (100 ng/ml) in die obere Kammer gegeben. Ein PAR₁-Agonist (100 µM) oder ein PAR₄-Agonist (400 µM) wurden je nach Versuchsansatz in die untere Kammer gegeben. Die Zellen wanderten durch eine Polycarbonatmembran. Nach 24h wurden die migrierten Zellen fixiert, gefärbt und mikroskopisch gezählt. Die Abbildung zeigt die Anzahl migrierter Zellen bei verschiedenen Versuchsansätzen. Die Versuchsansätze wurden 8-fach durchgeführt (n=8). Die Werte wurden gemittelt und grafisch dargestellt. Die Kontrolle beinhaltet nur RPMI 1640. Das Experiment ist repräsentativ für zwei unabhängige Assays. Die statistische Auswertung erfolgte durch den Mann-Whitney-Test. *p<0,05 gilt als statistisch signifikant. Ergebnisse von besonderem Interesse sind rot markiert.

Wie in den vorherigen Versuchen bereits festgestellt, konnte auch in diesem Experiment die migrationssteigernde Wirkung des PAR₁-Agonisten, des PAR₄-Agonisten und von rhNoggin wiederholt dargestellt werden. Für jeden dieser drei Versuchsansätze ergibt sich eine signifikante Steigerung der Anzahl migrierter Zellen durch eine Polycarbonatmembran nach 24h im Vergleich zur Kontrolle. Dabei sind die Wirkungen der PAR-Agonisten vergleichbar. Die PAR-Agonisten führen gegenüber rhNoggin zu einer stärkeren Migrationssteigerung. Diese ist jedoch nicht signifikant.

Eine Kombination des PAR₁-Agonisten und von rhNoggin bewirkt keine Zunahme der Anzahl migrierter Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Jedoch wird unter diesen Voraussetzungen der migrationssteigernde Effekt des PAR₁-Agonisten auf die Hep3B-Zellen durch den kombinierten Einsatz mit rhNoggin gehemmt. Hierbei ist eine signifikante Abnahme der Migration auf das Ausgangsniveau zu verzeichnen. Wurde der PAR₄-Agonist an Stelle des PAR₁-Agonisten in Kombination mit rhNoggin eingesetzt, so ergeben sich vergleichbare Resultate bezüglich der Migration. Durch den gleichzeitigen Einfluss von rhNoggin wird die vorher durch den PAR₄-Agonisten gesteigerte Migration der Zellen vermindert. Die Anzahl migrierter Zellen nimmt hierbei signifikant auf das Kontrollniveau ab.

4.3.6 Einfluss von Thrombin in Kombination mit Dorsomorphin auf die Migration von Hep3B-Zellen

Noggin, ein unspezifischer BMP-Inhibitor, hemmt die migrationssteigernde Wirkung von Thrombin, des PAR₁- und des PAR₄-Agonisten (**Abb. 27** und **Abb. 28**). Für ein besseres Verständnis dieser, durch ein Mitglied der BMP-Familie vermittelten Wirkung auf die Migration von Hep3B-Zellen, wurde Dorsomorphin im folgenden Experiment als mögliche migrationsmodifizierende Substanz eingesetzt. Dorsomorphin blockt BMP-Signale, indem es die Typ-1-BMP-Rezeptoren Alk2, Alk3 und Alk6 selektiv hemmt. Dies wiederum führt zur einer Blockade der BMP-vermittelten Smad1/5/8-Phosphorylation und der Transkription von Zielgenen (Yu et al. 2008). Auf Grundlage dessen wurde untersucht, ob Dorsomorphin mit rhNoggin vergleichbare, nun rezeptorvermittelte Effekte auf die Migration von Hep3B-Zellen aufweisen kann. Die Ergebnisse sind in **Abb. 29** dargestellt.

Betrachtet man die Wirkung von Dorsomorphin, so ist, verglichen zur Kontrolle, keine Änderung des Ausmaßes der Zellmigration zu verzeichnen. Thrombin führt hingegen, wie in vorherigen Versuchen bereits wiederholt dargestellt, gegenüber der Kontrolle und dem Dorsomorphineinfluss zu einer signifikant gesteigerten Migrationsrate. Durch einen kombinierten Einsatz von Thrombin mit Dorsomorphin wird die Thrombinwirkung gehemmt und die Anzahl migrierter Zellen signifikant vermindert. Im Vergleich zur Kontrolle bleibt die Migration der Hep3B-Zellen nach 24h unter Einwirkung beider Substanzen dennoch erhöht.

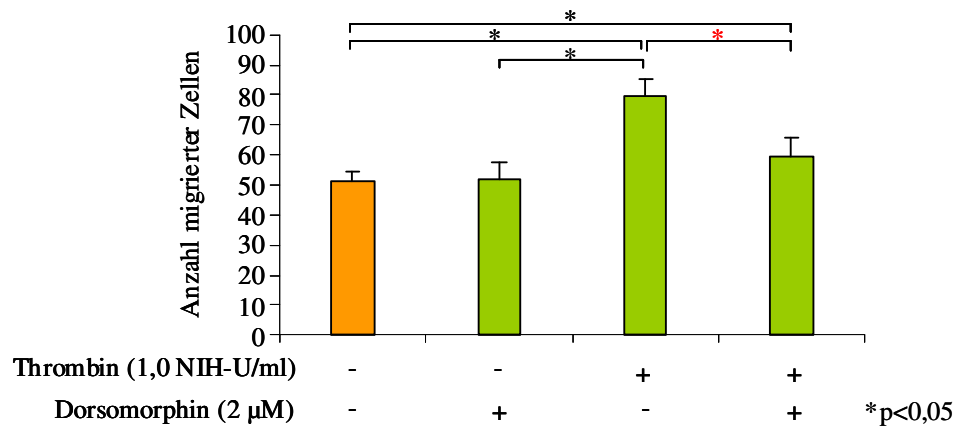


Abb. 29 Hemmung der durch Thrombin stimulierten Migration von Hep3B-Zellen durch Dorsomorphin. Das Migrations-Assay wurde mittels einer 48-Well Boyden Chamber von NeuroProbe durchgeführt. Die Zellen wurden serumfrei gehalten (nur RPMI 1640) und unter Zugabe der migrationsmodifizierenden Substanz Dorsomorphin (2 µM) in die obere Kammer gegeben. Thrombin (1,0 NIH-U/ml) wurde in die untere Kammer gegeben. Die Zellen wanderten durch eine Polycarbonatmembran. Nach 24h wurden die migrierten Zellen fixiert, gefärbt und mikroskopisch gezählt. Die Abbildung zeigt die Anzahl migrierter Zellen bei verschiedenen Versuchsansätzen. Die Versuchsansätze wurden 8-fach durchgeführt (n=8). Die Werte wurden gemittelt und grafisch dargestellt. Die Kontrolle beinhaltet nur RPMI 1640. Das Experiment ist repräsentativ für zwei unabhängige Assays. Die statistische Auswertung erfolgte durch den Mann-Whitney-Test. *p<0,05 gilt als statistisch signifikant. Ergebnisse von besonderem Interesse sind rot markiert.

4.3.7 Einfluss des PAR₁-Agonisten in Kombination mit Dorsomorphin auf die Migration von Hep3B-Zellen

Eine mit rhNoggin vergleichbare Wirkung von Dorsomorphin, eine Hemmung der durch Thrombin stimulierten Zellmigration, konnte im vorherigen Versuch demonstriert werden. Im folgenden Experiment wurde daher analysiert, ob die durch den PAR₁-Agonisten gesteigerte Migration der Hep3B-Zellen ebenfalls durch Dorsomorphin gehemmt werden kann. Übereinstimmend mit dem vorherigen Versuch bewirkt Dorsomorphin, verglichen zur Kontrolle, keine Änderung des Ausmaßes der Zellmigration, während der PAR₁-Agonist die Migration steigert. Durch einen kombinierten Einsatz des PAR₁-Agonisten mit Dorsomorphin wird die migrationssteigernde Wirkung des PAR₁-Agonisten gehemmt und die Anzahl migrierter Zellen signifikant auf das Ausgangsniveau vermindert (**Abb. 30**).

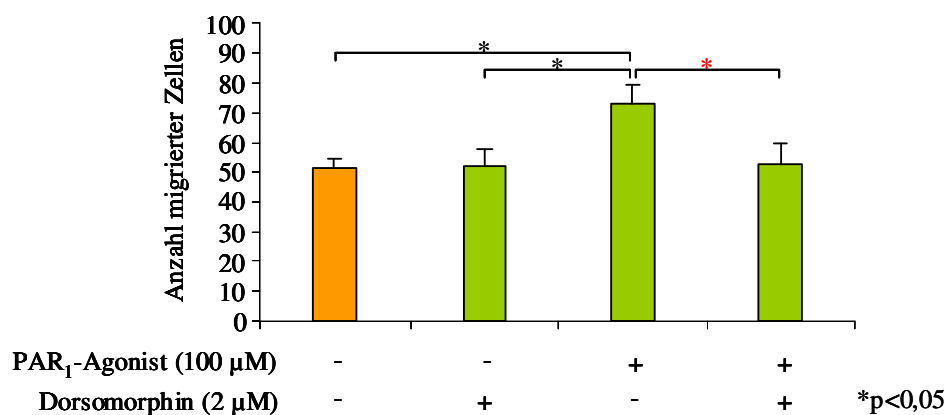


Abb. 30 Hemmung der durch den PAR₁-Agonisten stimulierten Migration von Hep3B-Zellen durch Dorsomorphin.

Das Migrations-Assay wurde mittels einer 48-Well Boyden Chamber von NeuroProbe durchgeführt. Die Zellen wurden serumfrei gehalten (nur RPMI 1640) und unter Zugabe der migrationsmodifizierenden Substanz Dorsomorphin (2 µM) in die obere Kammer gegeben. Der PAR₁-Agonist (100 µM) wurde in die untere Kammer gegeben. Die Zellen wanderten durch eine Polycarbonatmembran. Nach 24h wurden die migrierten Zellen fixiert, gefärbt und mikroskopisch gezählt. Die Abbildung zeigt die Anzahl migrierter Zellen bei verschiedenen Versuchsansätzen. Die Versuchsansätze wurden 8-fach durchgeführt (n=8). Die Werte wurden gemittelt und grafisch dargestellt. Die Kontrolle beinhaltet nur RPMI 1640. Das Experiment ist repräsentativ für zwei unabhängige Assays. Die statistische Auswertung erfolgte durch den Mann-Whitney-Test. *p<0,05 gilt als statistisch signifikant. Ergebnisse von besonderem Interesse sind rot markiert.

4.3.8 Ausschluss von Proliferation mittels Mitomycin-Test

Eine Beeinflussung der Migrationsrate durch proliferative Effekte von Thrombin und von den PAR-Agonisten wurde bereits in vorangegangenen analogen Experimenten der Arbeitsgruppe Kaufmann unter Verwendung des Proliferationsinhibitors Mitomycin ausgeschlossen.

4.4 Untersuchung der Interaktionen des BMP-Systems und des Thrombin-/PAR-Systems auf Proteinebene mittels Western Blot

In den Migrationsversuchen konnten Effekte verschiedener Substanzen auf Aktivitätsebene nachgewiesen und Interaktionen des BMP-Systems und des Thrombin-/PAR-Systems genauer analysiert werden. Dabei wurde demonstriert, dass sowohl Noggin, ein unspezifischer BMP-Inhibitor, als auch Dorsomorphin, ein selektiver Hemmer von Typ-1-BMP-Rezeptoren, die durch Thrombin und die PAR-Agonisten stimulierte Migration hemmen. Auf Grundlage dessen wurde zusätzlich überprüft, ob Dorsomorphin zu einer geänderten Aktivierung von Signalwegen führt. Für Proteinuntersuchungen wurden daher Hep3B-Zellen für 24h mit unterschiedlichen Konzentrationen an Dorsomorphin (2, 5, 10 μ M) und mit rhBMP-2 (100 ng/ml) als Positivkontrolle inkubiert. Als Negativkontrolle wurde ein Teil der Zellen nicht stimuliert (serumfreies RPMI 1640 + 1% DMSO). Im Anschluss wurden die Proteine isoliert und mittels SDS-PAGE gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Proteine wurden auf eine PVDF-Membran geblottet und die Aktivierung verschiedener Signalwege mit phosphospezifischen Antikörpern mittels Western Blot untersucht. Die Blots wurden mit dem Programm AIDA Image Analyser 3.52 ausgewertet. Es wurde der Quotient aus der Menge an phosphoryliertem Protein und Gesamtprotein gebildet. Schließlich wurden die Werte zur versuchsinternen Kontrolle, serumfreies Medium plus 1% DMSO, bezogen und grafisch dargestellt.

4.4.1 Phosphorylierungsstatus von Smad1/5/8 nach Inkubation von Hep3B-Zellen mit Dorsomorphin

Um zunächst die Aktivität von Dorsomorphin, das eine Hemmung der Phosphorylierung von Smad1/5/8 bewirkt (Yu et al. 2008), selbst zu bestimmen, wurden spezifische Antikörper gegen die phosphorylierte Form von Smad1/5/8 und gegen das Gesamtprotein eingesetzt. Die Ergebnisse des Experimentes sind in **Abb. 31** dargestellt.

Hierbei zeigt sich, dass Dorsomorphin eine konzentrationsabhängige Hemmung der Phosphorylierung von Smad1/5/8 induziert. Verglichen zur Kontrolle (sf) bewirken bereits 2 μ M Dorsomorphin eine Abnahme der Phosphorylierung auf etwa ein Drittel des Ausgangsniveaus. Mit Zunahme der eingesetzten Menge an Dorsomorphin nimmt die Phosphorylierung von Smad1/5/8 weiter ab. Wurden die Zellen mit 100 ng/ml rhBMP-2 inkubiert, so bleibt der Phosphorylierungsgrad nahezu unbeeinflusst. Von der Inkubation bleibt das Gesamtprotein Smad1/5/8 ebenso unbeeinflusst.

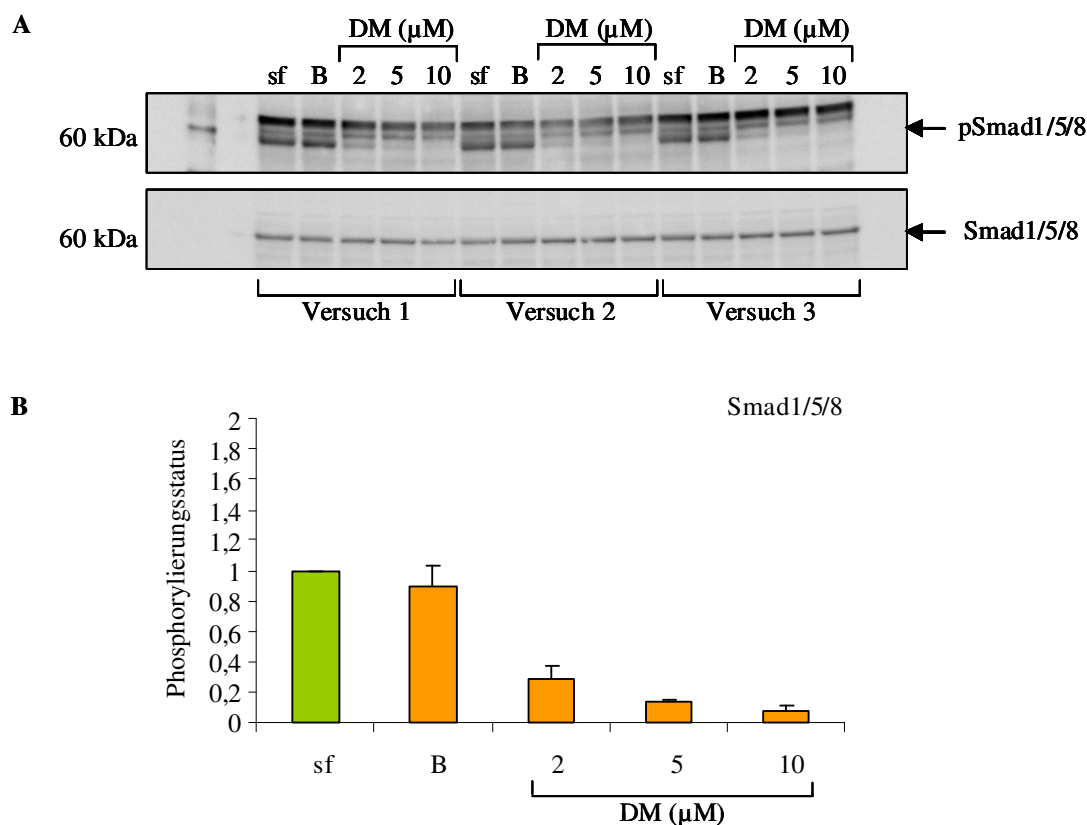


Abb. 31 Phosphorylierungsstatus von Smad1/5/8 nach Inkubation von Hep3B-Zellen.

Die Zellen wurden für 24h mit unterschiedlichen Konzentrationen an Dorsomorphin (DM) (2, 5, 10 μM) und mit rhBMP-2 (B) (100 ng/ml) als Positivkontrolle inkubiert. Als Negativkontrolle (sf) wurde ein Teil der Zellen nicht stimuliert (serumfreies RPMI 1640 + 1% DMSO). Die Proteine wurden isoliert, gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Es wurden spezifische Antikörper gegen pSmad1/5/8 und Smad1/5/8 eingesetzt. Das Experiment wurde dreifach durchgeführt (n=3). Abb. A zeigt die Bilder der Proteinbanden. Diese wurden mit dem Programm AIDA Image Analyser 3.52 ausgewertet. Es wurde der Quotient aus der Menge an phosphoryliertem Protein und Gesamtprotein gebildet. Die Werte wurden zur versuchsinternen Kontrolle, serumfreies Medium plus 1% DMSO, bezogen, gemittelt und in Abb. B grafisch dargestellt.

4.4.2 Phosphorylierungsstatus der p44/42 MAP-Kinase nach Inkubation von Hep3B-Zellen mit Dorsomorphin

In einer weiteren Proteinuntersuchung wurden spezifische Antikörper gegen die phosphorylierte Form der p44/42 MAP-Kinase (MAPK) und gegen das Gesamtprotein eingesetzt. **Abb. 32** stellt die Ergebnisse des Experimentes dar. Bei diesem Protein steigert Dorsomorphin konzentrationsabhängig die Phosphorylierung. Durch den Einsatz von 2 μM Dorsomorphin erhöht sich der Phosphorylierungsgrad der p44/42 MAPK auf das 1,4-fache. Das Maximum, eine um 1,7-fach gesteigerte Phosphorylierung, wird durch 10 ng/ml Dorsomorphin erreicht. Relativ unbeeinflusst bleibt die Phosphorylierung und somit die

Aktivität der p44/42 MAPK nach Inkubation mit 100 ng/ml rhBMP-2. Auf das Gesamtprotein haben rhBMP-2 und Dorsomorphin nahezu keinen Einfluss (**Abb. 32A**).

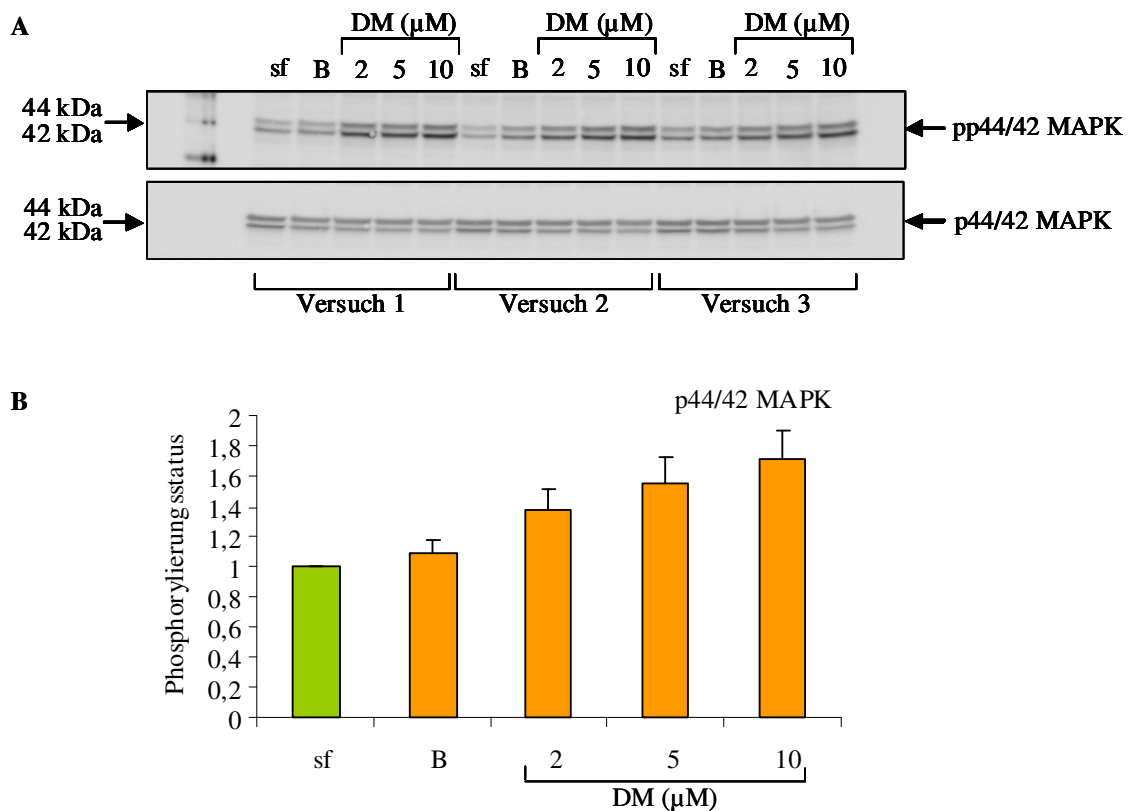


Abb. 32 Phosphorylierungsstatus der p44/42 MAPK nach Inkubation von Hep3B-Zellen.

Die Zellen wurden für 24h mit unterschiedlichen Konzentrationen an Dorsomorphin (DM) (2, 5, 10 μM) und mit rhBMP-2 (B) (100 ng/ml) als Positivkontrolle inkubiert. Als Negativkontrolle (sf) wurde ein Teil der Zellen nicht stimuliert (serumfreies RPMI 1640 + 1% DMSO). Die Proteine wurden isoliert, gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Es wurden spezifische Antikörper gegen pp44/42 MAPK und p44/42 MAPK eingesetzt. Das Experiment wurde dreifach durchgeführt (n=3). Abb. A zeigt die Bilder der Proteinbanden. Diese wurden mit dem Programm AIDA Image Analyser 3.52 ausgewertet. Es wurde der Quotient aus der Menge an phosphoryliertem Protein und Gesamtprotein gebildet. Die Werte wurden zur versuchsinternen Kontrolle, serumfreies Medium plus 1% DMSO, bezogen, gemittelt und in Abb. B grafisch dargestellt.

4.4.3 Phosphorylierungsstatus der p38 MAP-Kinase nach Inkubation von Hep3B-Zellen mit Dorsomorphin

Weiterhin wurde der Effekt von Dorsomorphin auf den Signalweg der p38 MAP-Kinase (MAPK) untersucht. Auch bei diesem Experiment wurden spezifische Antikörper gegen die phosphorylierte Form der p38 MAP-Kinase (MAPK) und gegen das Gesamtprotein eingesetzt. **Abb. 33** stellt die Ergebnisse dar. Der phosphorylierte Anteil des Proteins ist verglichen mit dem Gesamtprotein gering (**Abb. 33A**). Betrachtet man die phosphorylierte Form der p38 MAPK, so fällt auf, dass durch die Inkubation mit rhBMP-2 und mit 2 μM oder 5 μM Dorsomorphin die Phosphorylierung und die damit verbundenen Aktivität des Proteins

nahezu nicht modifiziert wird. Unter Einwirkung von 10 μM Dorsomorphin scheint eine gesteigerte Phosphorylierung der p38 MAPK vorzuliegen (**Abb. 33B**).

Unter Betrachtung der Standardabweichung ist dieser Effekt jedoch kritisch zu betrachten.

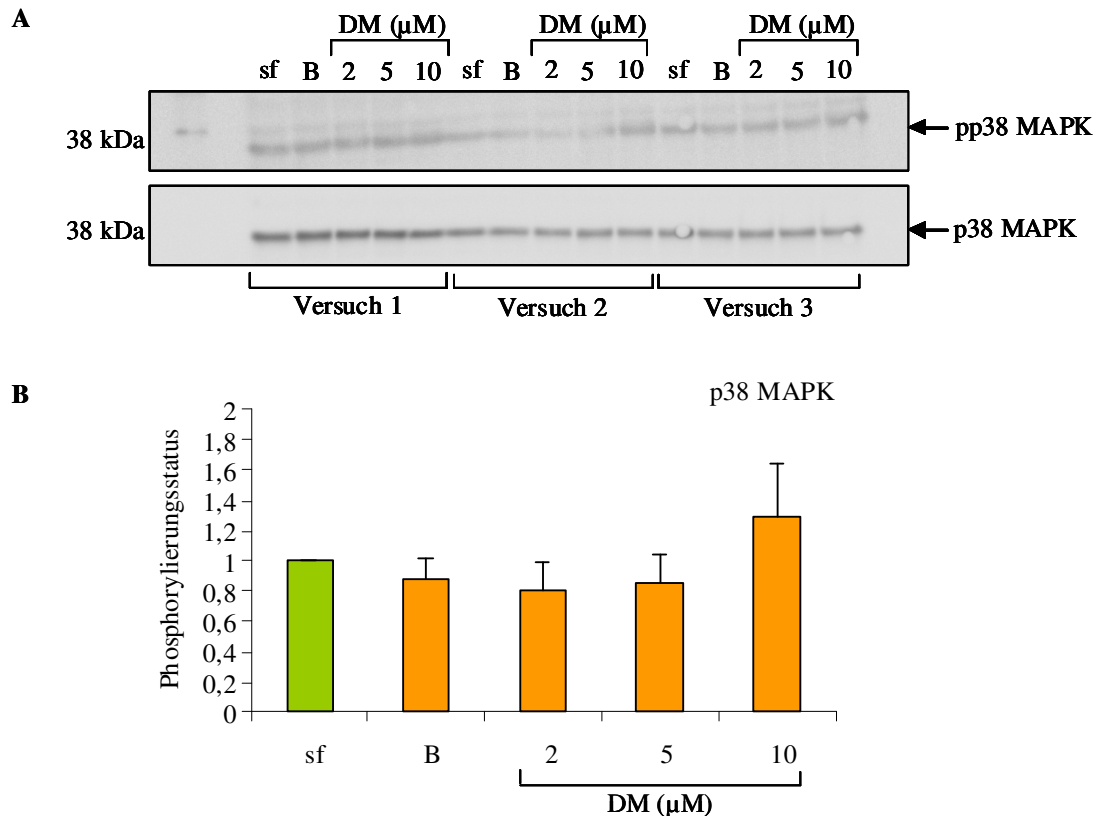


Abb. 33 Phosphorylierungsstatus der p38 MAPK nach Inkubation von Hep3B-Zellen.

Die Zellen wurden für 24h mit unterschiedlichen Konzentrationen an Dorsomorphin (DM) (2, 5, 10 μM) und mit rhBMP-2 (B) (100 ng/ml) als Positivkontrolle inkubiert. Als Negativkontrolle (sf) wurde ein Teil der Zellen nicht stimuliert (serumfreies RPMI 1640 + 1% DMSO). Die Proteine wurden isoliert, gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Es wurden spezifische Antikörper gegen pp38 MAPK und p38 MAPK eingesetzt. Das Experiment wurde dreifach durchgeführt (n=3). **Abb. A** zeigt die Bilder der Proteinbanden. Diese wurden mit dem Programm AIDA Image Analyser 3.52 ausgewertet. Es wurde der Quotient aus der Menge an phosphoryliertem Protein und Gesamtprotein gebildet. Die Werte wurden zur versuchsinternen Kontrolle, serumfreies Medium plus 1% DMSO, bezogen, gemittelt und in **Abb. B** grafisch dargestellt.

4.4.4 Phosphorylierungsstatus von Akt nach Inkubation von Hep3B-Zellen mit Dorsomorphin

Die Aktivierung von Akt wurde als ein weiterer Signalweg untersucht. Auch hierbei wurden spezifische Antikörper gegen die phosphorylierte Form von Akt und gegen das Gesamtprotein eingesetzt. Die Ergebnisse des Experimentes zeigt **Abb. 34**. Dorsomorphin und rhBMP-2 induzieren eine Steigerung des Phosphorylierungsstatus von Akt, der verglichen mit dem Gesamtprotein jedoch allgemein niedrig erscheint (**Abb. 34A**). Das Maximum, eine 1,4-fach gesteigerte Phosphorylierung von Akt, wird durch 100 ng/ml rhBMP-2 und 2 μM Dorsomorphin erreicht. Wurden die Zellen mit höheren Konzentrationen von Dorsomorphin

inkubiert, so fällt die Steigerung der Phosphorylierung und der damit verbundenen Aktivierung von Akt geringer aus. Nach Inkubation mit 10 μM Dorsomorphin nähert sich der Phosphorylierungsstatus erneut dem Ausgangsniveau.

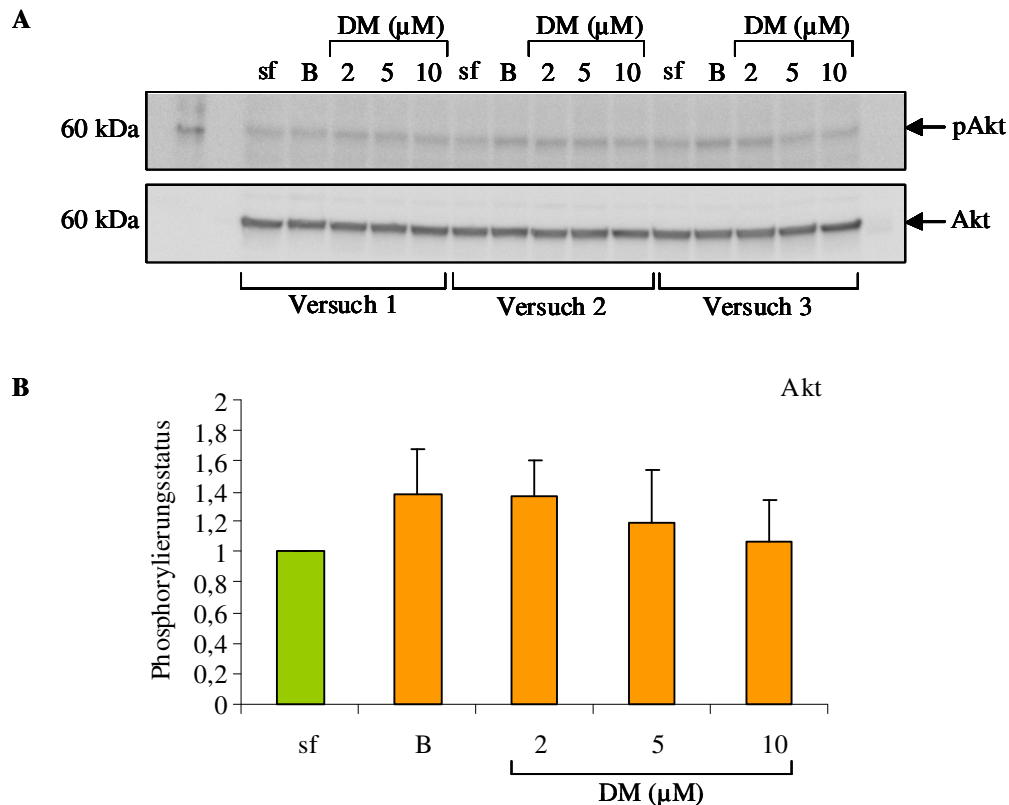


Abb. 34 Phosphorylierungsstatus von Akt nach Inkubation von Hep3B-Zellen.

Die Zellen wurden für 24h mit unterschiedlichen Konzentrationen an Dorsomorphin (DM) (2, 5, 10 μM) und mit rhBMP-2 (B) (100 ng/ml) als Positivkontrolle inkubiert. Als Negativkontrolle (sf) wurde ein Teil der Zellen nicht stimuliert (serumfreies RPMI 1640 + 1% DMSO). Die Proteine wurden isoliert, gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Es wurden spezifische Antikörper gegen pAkt und Akt eingesetzt. Das Experiment wurde dreifach durchgeführt ($n=3$). Abb. A zeigt die Bilder der Proteinbanden. Diese wurden mit dem Programm AIDA Image Analyser 3.52 ausgewertet. Es wurde der Quotient aus der Menge an phosphoryliertem Protein und Gesamtprotein gebildet. Die Werte wurden zur versuchsinternen Kontrolle, serumfreies Medium plus 1% DMSO, bezogen, gemittelt und in Abb. B grafisch dargestellt.

4.4.5 Phosphorylierungsstatus von Met nach Inkubation von Hep3B-Zellen mit Dorsomorphin

In einer folgenden Untersuchung wurde analysiert, ob die durch Dorsomorphin bewirkte Blockade des Typ-1-BMP-Rezeptors eine weitere Signaltransduktionskaskade beeinflusst. Letztlich wurde der Effekt auf Met untersucht. Durch Bindung des Hepatocyte Growth Factors (HGF), bei dem es sich um den natürlichen Liganden handelt, werden über den Met-Rezeptor multiple biologische Funktionen wie Zellproliferation, Invasion, Migration, Morphogenese und Überleben epithelialer Zellen reguliert (Birchmeier et al. 2003, Zhang und Vande Woude 2003, Rosario und Birchmeier 2003).

Auch bei diesem Experiment wurden spezifische Antikörper gegen die phosphorylierte Form von Met und gegen das Gesamtprotein eingesetzt. Die Ergebnisse sind in **Abb. 35** dargestellt.

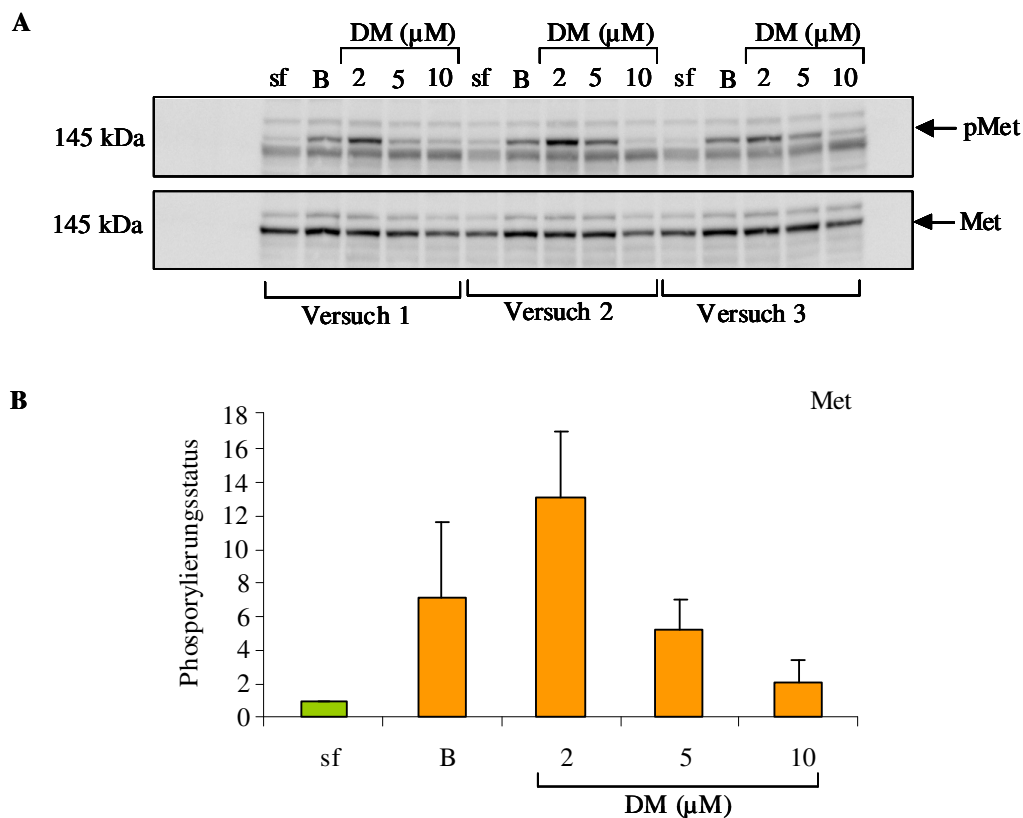


Abb. 35 Phosphorylierungsstatus von Met nach Inkubation von Hep3B-Zellen.

Die Zellen wurden für 24h mit unterschiedlichen Konzentrationen an Dorsomorphin (DM) (2, 5, 10 μM) und mit rhBMP-2 (B) (100 ng/ml) als Positivkontrolle inkubiert. Als Negativkontrolle (sf) wurde ein Teil der Zellen nicht stimuliert (serumfreies RPMI 1640 + 1% DMSO). Die Proteine wurden isoliert, gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Es wurden spezifische Antikörper gegen pMet und Met eingesetzt. Das Experiment wurde dreifach durchgeführt ($n=3$). Abb. A zeigt die Bilder der Proteinbanden. Diese wurden mit dem Programm AIDA Image Analyser 3.52 ausgewertet. Es wurde der Quotient aus der Menge an phosphoryliertem Protein und Gesamtprotein gebildet. Die Werte wurden zur versuchsinternen Kontrolle, serumfreies Medium plus 1% DMSO, bezogen, gemittelt und in Abb. B grafisch dargestellt.

Wurden die Zellen weder mit rhBMP-2 noch mit Dorsomorphin inkubiert, so ist die Phosphorylierung der Kontrolle gering. 100 ng/ml rhBMP-2 bewirken einen 7-fach gesteigerten Phosphorylierungsgrad von Met gegenüber der Kontrolle. Dieser kann durch 2 μM Dorsomorphin weiter gesteigert werden und erreicht mit einem Anstieg auf das 13-fache das Maximum. Höhere Konzentrationen an Dorsomorphin induzieren ebenfalls eine Steigerung der Phosphorylierung von Met. Diese fällt verglichen zu der Einwirkung von 2 μM Dorsomorphin geringer aus, ist im Vergleich zur Kontrolle jedoch weiterhin erhöht.

5 Diskussion

Das hepatozelluläre Karzinom gehört heute zu den fünf häufigsten Malignomen weltweit und steht an dritter Stelle der Krebs-assoziierten Todesursachen (Parkin et al. 2001, El-Serag 2002). Bei dem HCC handelt es sich um einen hochmalignen Tumor mit rascher Progredienz und schlechter Prognose, wodurch sich ein großes therapeutisches Problem ergibt. Auf Grund fehlender oder geringer Symptomatik wird es häufig erst in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert und ist zum Zeitpunkt der Diagnose oftmals inoperabel (Greten et al. 2009). Bis dato gibt es keine effektive systemische Chemotherapie (McKillop et al. 2006). Alternative, vor allem palliative Behandlungsstrategien sind Patienten mit lokalisierten Tumoren vorbehalten (Pang et al. 2006) und besitzen ebenso keinen therapeutischen Benefit (McKillop et al. 2006). Die therapeutischen Optionen für das hepatozelluläre Karzinom sind dementsprechend unzureichend, so dass die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien im Sinne einer zielgerichteten Therapie dringend erforderlich ist.

Für einen derartigen Ansatz ist die Identifizierung vielfältig veränderter, molekularer Mechanismen in der Hepatokarzinogenese eine entscheidende Voraussetzung. So gewinnen gegenwärtig zielgerichtete molekulare Therapien an Bedeutung. Insbesondere wird eine Kombinationstherapie zur Inhibierung mehrerer Rezeptorsysteme als ein viel versprechendes Konzept mit Vorteilen gegenüber einer Monotherapie beurteilt (Höpfner et al. 2008). Dabei unterstützen erste Ergebnisse mit dem Multi-Target-Inhibitor Sorafenib (Bay-43-9006), einem für die Therapie des fortgeschrittenen HCCs kürzlich zugelassenen Medikaments, diese Strategie (Tanaka und Arii 2009).

Insgesamt wird die Charakterisierung weiterer möglicher, in die Hepatokarzinogenese involvierter Signalwege und deren Interaktionen als eine entscheidende Voraussetzung für die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze für das HCC eingeschätzt.

Vor diesem Hintergrund wurde im Rahmen der vorliegenden Dissertationsarbeit untersucht, ob ebenso Mitglieder des BMP-Signalwegs im HCC nachweisbar sind und ob Interaktionen zwischen diesem und dem Signalweg der Proteinase-aktivierten Rezeptoren (PARs) bestehen. Beide Signalwege wirken tumorigen und besitzen eine große Bedeutung während der Entwicklung und Progression verschiedenster Tumorentitäten.

Während BMP-Signale eine kritische Rolle in der Hepatogenese spielen (Rossi et al. 2001), lagen bis dato zur Expression und tumorbiologischen Relevanz der Bone Morphogenetic Proteins im hepatozellulären Karzinom nur wenige Befunde vor. So wurden Mutationen von Smad2 und Smad4 im HCC beobachtet (Yakicier et al. 1999). Des Weiteren konnte bisher

bereits gezeigt werden, dass inhibitorische BMP-7-Signale durch in HCCs überexprimiertes Glypican-3 unterdrückt und negativ reguliert werden (Midorikawa et al. 2003). BMP-2 wurde als negativer Regulator der Proliferation von Hepatozyten beschrieben (Xu et al. 2006), während BMP-9, dessen Rezeptoren von der humanen HCC-Zelllinie HepG2 exprimiert werden, die Proliferation dieser Zellen stimuliert (Song et al. 1995).

In der vorliegenden Arbeit wird erstmals gezeigt, dass etablierte humane Zelllinien des HCCs alle notwendigen Komponenten für ein aktives BMP-Signaling exprimieren.

Hierfür wurde die Genexpression von BMPs (BMP-2, BMP-3, BMP-5, BMP-6, BMP-7), von BMP-Rezeptoren (BMPR-IA, BMPR-IB, BMPR-II), von Aktivinrezeptoren (AktR-IA, AktR-IB, AktR-IIA, AktR-IIB) und von BMP-Inhibitoren (Gremlin, Noggin, Dan, Chordin) an den etablierten Zelllinien Hep3B, HepG2 und Sk-Hep1 sowohl mittels qualitativer RT-PCR als auch mittels quantitativer realtime-PCR analysiert. Als interne Kontrolle diente das Housekeeping-Gen β -Aktin, auf das die in der realtime-PCR erhaltenen Transkriptmengen, nachdem sie gemittelt wurden, abgeglichen wurden. Vor allem die realtime-PCR ergab ein differentielles Expressionsmuster der Komponenten des BMP-Signalsystems in allen drei Zelllinien. Dabei weisen die meisten Gene in der Zelllinie Hep3B, verglichen zu HepG2 und Sk-Hep1, ein höheres Expressionslevel auf. Zudem wird deutlich, dass nicht nur BMPs und deren Rezeptoren in den Zelllinien des hepatozellulären Karzinoms exprimiert werden. Ebenso sind auch inhibitorische BMPs und BMP-Inhibitoren, auf extrazellulärer Ebene wirkende, negative Modulatoren der BMP-Signalweiterleitung, nachweisbar. Dabei werden von den BMPs BMP-2 und BMP-7 in der Zelllinie Hep3B am höchsten exprimiert, wobei in den Zelllinien HepG2 und Sk-Hep1 BMP-7 den höchsten Expressionslevel aufweist. BMP-3 ist in allen drei Zelllinien übereinstimmend nicht nachweisbar. In der Literatur wird beschrieben, dass BMP-2 tumorigene Eigenschaften in einer Vielzahl anderer Tumorentitäten besitzt. Dabei wird BMP-2 unter anderem in Sarkomen exprimiert, wodurch seine potentielle Rolle für eine autokrine und parakrine Wachstumsstimulation indiziert wird (Guo et al. 1999). In der Brustkrebszelllinie MCF-7 führt BMP-2 zu sequentiellen Änderungen der Expression von ID-Genen, welche Zielgene des BMP-Signalwegs darstellen (Clement et al. 2000), während das Wachstum der Pankreaskarzinom-Zelllinien ASPC-1 und CAPAN-1 durch BMP-2 stimuliert wird (Kleeff et al. 1999). Ebenso reguliert BMP-2 das Wachstum von Prostatakarzinom-Zelllinien (Ide et al. 1997) und erhöht deren Motilität über eine Aktivierung von Integrinen (Lai et al. 2008). Vergleichbare protumorigene Effekte von BMP-2 und BMP-7 sind ebenso im hepatozellulären Karzinom denkbar. Letzteres beeinflusst unter anderem die Proliferation, die Migration und die Invasion von Brustkrebs-Zelllinien (Alarmo et al. 2009).

Die Expression von BMP-7 korreliert in kolorektalen Tumoren mit der Lebermetastasierung sowie mit einer schlechten Prognose (Motoyama et al. 2008) und ist im metastasierten Prostatakarzinom erhöht (Masuda et al. 2003). BMP-3 wird in Tumoren niedrig bis gar nicht exprimiert, so unter anderem in Zelllinien des HCCs. Weitere Arbeiten zeigten ähnliche Ergebnisse. So ist BMP-3 in der Entwicklung von kolorektalen Karzinomen inaktiviert (Loh et al. 2008). Im Lungenkarzinom ist die Expression unterdrückt, wodurch die Tumorentwicklung gefördert wird (Dai et al. 2004). In der Brustkrebs-Zelllinie MCF-7 liegt ebenso nur eine geringe BMP-3-Expression vor (Arnold et al. 1999). Zur Einschätzung der tumorbiologischen Relevanz von BMP-2, BMP-3 und BMP-7 sowie weiterer Komponenten des BMP-Signalsystems im HCC bedarf es jedoch zusätzlichen Untersuchungen.

Der Nachweis aller für ein aktives BMP-Signaling notwendigen Komponenten, einschließlich inhibitorischer BMPs und negativ regulatorischer BMP-Inhibitoren, sowie deren Wirkung in verschiedenen Malignomen lässt insgesamt eine Beteiligung von Mitgliedern des BMP-Netzwerkes ebenso an der Entstehung und Progression des hepatozellulären Karzinoms vermuten. Bekräftigt wird diese Annahme durch den erst kürzlichen Nachweis einer BMP-4-Überexpression im HCC und einer mit dieser im Zusammenhang stehenden Tumorprogression (Maegdefrau et al. 2009).

Über mögliche Interaktionen des BMP-Systems und des Thrombin- /PAR-Systems liegen insgesamt wenige Informationen vor. Auf Grundlage dessen wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmals mögliche Regulationen zwischen Mitgliedern beider Signalsysteme mittels Inkubationsversuchen und realtime-PCR auf Transkriptionsebene untersucht. Dafür wurden die Zellen für 4h und 24h mit Effektoren inkubiert. Die Expression der untersuchten Gene wurde mittels realtime-PCR quantifiziert. Als interne Kontrolle diente das Housekeeping-Gen β -Aktin. Auf dieses wurden die ermittelten Transkriptmengen abgeglichen und im Anschluss auf die Kontrolle, serumfreies Medium, bezogen. Die Versuche wurden mehrfach durchgeführt und abschließend gemittelt. Auf Grund der dennoch geringen Anzahl an Versuchsdurchläufen wurde keine Statistik durchgeführt. Beträgt der Expressionslevel der einzelnen Gene nach Inkubation $< 0,5$ oder $> 2,5$, so wird von einer starken Regulation ausgegangen. Unter Berücksichtigung der Standardabweichungen sind die Ergebnisse jedoch kritisch zu bewerten.

Im Rahmen des Versuchsansatzes wurde zunächst der Einfluss von PAR-Agonisten auf die Expression von Mitgliedern und Zielgenen des BMP-Netzwerkes analysiert.

Die Rolle der Proteinase-aktivierten Rezeptoren (PAR 1, 2, 3 und 4) in der Karzinogenese verschiedener Tumoren ist bereits in zahlreichen Publikationen beschrieben. Ebenso konnten

die Expression sowie die Effekte von PAR₁ und PAR₄ auf Signalweiterleitungs- und zellulärer Ebene in HCC-Zellen aufgezeigt werden (Kaufmann et al. 2007). Basierend auf diesen Vorkenntnissen wurde zunächst untersucht, ob die Expression der oben genannten Komponenten des BMP-Signalnetzwerkes sowie die Expression der BMP-Zielgene ID-1 und ID-2 durch die PARs reguliert werden kann. Dafür wurden spezifische Agonisten für PAR₁, PAR₂ und PAR₄ in Inkubationsversuchen bei den drei humanen HCC-Zelllinien Hep3B, HepG2 und Sk-Hep1 eingesetzt.

Unter Berücksichtigung der Standardabweichungen und unter Voraussetzung der Änderung der Expressionslevel einzelner Gene nach Inkubation $<0,5$ oder $>2,5$, um von einer starken Regulation auszugehen, zeigt sich bei allen drei humanen HCC-Zelllinien keine gravierende Beeinflussung der Expression der Komponenten des BMP-Signalsystems und der BMP-Zielgene nach Einsatz der PAR-Agonisten. Jedoch sind die Ergebnisse durch die geringe Anzahl der Versuchsdurchläufe ($n=2$) und die damit einhergehenden großen Standardabweichungen kritisch zu bewerten. Zusammenfassend ist dennoch davon auszugehen, dass keine Interaktionen des BMP-Systems und des Thrombin-/PAR-Systems auf Transkriptionsebene bestehen.

Um mögliche Interaktionen beider Signalwege genauer zu analysieren, wurden weitere Inkubationsversuche durchgeführt. Dabei wurde zunächst rhBMP-2, ein natürlicher BMP-Rezeptor-Agonist, eingesetzt und dessen Einfluss sowohl auf das eigene BMP-System als auch auf das Thrombin-/PAR-System bei den Zelllinien Hep3B, HepG2 und Sk-Hep1 untersucht. Als Zielgene des BMP-Systems wurden die Gene ID-1 und ID-2 gewählt, als Thrombin-Zielgene wurden die Gene VEGF und Met untersucht.

Die ID-Proteine gehören zu den Helix-loop-Helix-Proteinen (HLH), jedoch fehlt ihnen die basische, DNA-bindende Domäne. Durch die Bildung nicht funktionaler, hetero-dimerer Komplexe gelten sie als negative Regulatoren der HLA-DNA-bindenden Proteine und als potente Inhibitoren der Differenzierung (Benezra et al. 1990). Dabei wurde zunächst ID-1 gefunden (Ogata et al. 1993, Katagiri et al. 1994). Von Hollnagel et al. wurden auch die ID-1 verwandten Proteine ID-2 und ID-3 in embryonalen Stammzellen als direkte BMP-Zielgene charakterisiert (Hollnagel et al. 1999). Clement et al. zeigten, dass in der Brustkrebs-Zelllinie MCF-7 die Expression von ID-1, ID-2 und ID-3 BMP-abhängig stark ansteigt (Clement et al. 2000). Auf Grundlage dessen wurde in der vorliegenden Arbeit anhand der HCC-Zelllinien Hep3B, HepG2 und Sk-Hep1 der konzentrationsabhängige (10-100 ng/ml) Effekt von rhBMP-2 auf die Expression der ID-Gene ID-1 und ID-2 untersucht, um genauere Vorstellungen über die Regulation dieser Gene und allgemeine Expressionsänderungen auf

Transkriptionsebene unter Einfluss von rhBMP-2 im HCC zu erlangen. Dabei wurden drei unabhängige Versuche in jeweiliger Doppelbestimmung (n=6) durchgeführt. Die Auswertung erfolgt dabei wie oben bereits beschrieben.

Als Voraussetzung einer starken Genregulation galt auch hierbei erst eine Veränderung der Expression der Gene $<0,5$ oder $>2,5$ nach Inkubation. Unter diesen Voraussetzungen führt BMP-2, unabhängig von der eingesetzten Konzentration, nur zu geringen Änderungen der mRNA der ID-Gene in den humanen HCC-Zelllinien Hep3B und HepG2. Auch eine Verdopplung des Expressionslevels wurde nicht erreicht. Da eine deutliche Erhöhung des ID-mRNA-Gehalts durch BMP-2 in den Zelllinien Hep3B und HepG2 sowohl nach 4h als auch nach 24h nicht gefunden wurde, besteht die Möglichkeit, dass BMP-2 keinen Einfluss auf die Expression von ID-1 und ID-2 auf Transkriptionsebene dieser Zelllinien besitzt. Ob eine relativ hohe endogene BMP-2-Expression, wie beispielsweise in der Zelllinie Hep3B, eine weitere Expressionssteigerung durch die externe Stimulation mit BMP-2 inhibiert oder ob die Empfindlichkeit der Zellen auf äußere Stimuli dadurch herabgesetzt ist, ist fraglich. Die Ergebnisse bei diesen Zelllinien unterscheiden sich von der von Katagiri et al. beobachteten, zeitabhängigen Erhöhung des ID-mRNA-Gehalts durch BMP-2 in einer Myeloblasten-Zelllinie der Maus (Katagiri et al. 1994), des von Hollnagel et al. beschriebenen Anstiegs der mRNA der ID-Gene in embryonalen Stammzellen als „immediate early response“ (Hollnagel et al. 1999), der von Clement et al. beschriebenen starken Erhöhung der ID-Expression nach 4h und 24h in MCF-7-Zellen (Clement et al. 2000) und der von Yates et al. beobachteten Hochregulation der ID-Proteine nach 1h in transfizierten NIH-3T3-Zellen (Yates et al. 1999). Überraschend und deutlich gegensätzlich zu den Ergebnissen bei den Zelllinien Hep3B und HepG2 verhält es sich allerdings mit der Expression der ID-Gene ID-1 und ID-2 in der humanen HCC-Zelllinie Sk-Hep1 nach Inkubation mit rhBMP-2. Hierbei ist vor allem ein früher Effekt mit einer konzentrationsabhängigen Steigerung der Expression des ID-1-Gens nach 4h bis auf das 7-fache zu verzeichnen, während der BMP-2-Effekt nach 24h nicht mehr nachweisbar ist. Bei der humanen HCC-Zelllinie Sk-Hep1 wird die Expression der Helix-loop-Helix-Proteine ID-1 und ID-2 durch die externe Zugabe von BMP-2 dementsprechend zeitabhängig reguliert. Interessant wäre, ob auch noch frühere Expressionssteigerungen im Sinne einer „immediate early response“, wie sie von Hollnagel bereits in anderen Zellen beschrieben wurde (Hollnagel et al. 1999), auch bei der Zelllinie Sk-Hep1 vor 4h zu verzeichnen sind.

Zusammenfassend unterstützen die Ergebnisse zum einen die Beobachtung von Zeitabhängigen, vor allem frühen BMP-Effekten auf die Expression der ID-Gene (Katagiri et al.

1994, Clement et al. 2000), zum anderen deuten die Unterschiede in der ID-Expression nach externer Stimulation mit BMP-2 auf verschiedene, Zelltyp-spezifische Signalmechanismen hin. Eine Überexpression von ID-1 in zirrhotischem Lebergewebe wurde mit einem erhöhten Risiko der Entwicklung eines HCCs in Zusammenhang gebracht (Matsuda et al. 2005).

Während die Expression der Zielgene im eigenen System, die IDs, nur gering bzw. nur Zelltyp-spezifisch durch die externe Zugabe von rhBMP-2 auf Transkriptionsebene reguliert wird, findet keine Expressionsregulation der Zielgene des Thrombin-/PAR-Systems, Met und VEGF (vascular endothelial growth factor), statt. Beide Zielgene spielen eine Rolle in der Tumorprogression verschiedener Malignome. So führt unter anderem eine Thrombin-induzierte Expressions- und Sekretionssteigerung von VEGF (Maragoudakis et al. 2002) zu einer Erhöhung der Angiogenese und einer mit dieser in Zusammenhang stehenden Tumorprogression (Tsopanoglou und Maragoudakis 2004, Tsopanoglou und Maragoudakis 2007). Die VEGF-Expression wird jedoch nicht nur durch Thrombin erhöht, vielmehr wurde VEGF auch als Zielgen des BMP-Signalwegs identifiziert, indem eine expressionssteigernde Wirkung ebenso durch externe Stimulation mit BMP-2 auf VEGF erzielt werden kann (Raida et al. 2006, Schofer et al. 2009). Bei den im Rahmen der Arbeit durchgeführten Inkubationsversuchen kann der stimulierende Effekt von rhBMP-2 auf die Expression von VEGF jedoch nur bedingt festgestellt werden. Ebenso unverändert bleibt das Met-Expressionslevel nach Inkubation mit rhBMP-2. Diese Ergebnisse geben keine Hinweise darauf, dass Interaktionen zwischen beiden Signalwegen auf Transkriptionsebene stattfinden. Auch die Inkubation mit Thrombin im Umkehrschluss ergibt keine Anhaltspunkte für eine gegenseitige Regulation der Zielgene auf Transkriptionsebene.

Für eine weitere Analyse der Interaktionen des BMP-Systems und des Thrombin-/PAR-Systems wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Migration als ein komplexer, tumorbiologisch bedeutsamer Prozess anhand eines in-vitro Modells untersucht.

Prozesse mit einer erhöhten zellulären Motilität sind essentiell in physiologischen und pathophysiologischen Situationen, so während der Embryonalentwicklung, der Gewebereparatur und –regeneration und der Angiogenese. Im Tumorgeschehen besitzt die Migration eine entscheidende Rolle während der Metastasierung und Tumorprogression (Ridley et al. 2003). Dabei sind verschiedene Proteine an der Signaltransduktion beteiligt, die eine Reorganisation des Aktinzytoskeletts als eine Reaktion auf verschiedene, migratorisch wirksame Substanzen modulieren und die Grundlage für eine gerichtete Zellbewegung bilden (Gamell et al. 2008). In anderen Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass sowohl BMP- als auch PAR-vermittelte Signale die Migration von Tumorzellen beeinflussen. Basierend auf

diesen Vorkenntnissen wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von Thrombin, von PAR-Subtyp-selektiven Agonisten, rhBMP-2, BMP-Inhibitoren, BMP-Rezeptor-Inhibitoren oder deren Kombination auf die Migration von Hep3B-Zellen in einem Transwell-Kammer-System untersucht. Zur statistischen Auswertung wurde der nicht-parametrische Mann-Whitney-Test verwendet, bei dem zwei unabhängige Stichproben miteinander verglichen werden. Als statistisch signifikant wurde ein p-Wert von $< 0,05$ angesehen.

Der Versuchsaufbau wurde dabei so gewählt, dass zunächst die Wirkung von Mitgliedern des BMP-Systems und des Thrombin-/PAR-Systems einzeln auf die Migration der humanen HCC-Zelllinie Hep3B untersucht wurde. Es zeigte sich, dass Thrombin (1,0 NIH-U/ml), ein selektiver PAR₁-Agonist (100 μ M) und ein selektiver PAR₄-Agonist (400 μ M) eine signifikante Steigerung der Migrationsrate im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle induzieren. Dies ergänzt die Ergebnisse der Arbeitsgruppe von Roland Kaufmann, durch die derartige Versuche erstmals unter anderem an der HCC-Zelllinie Hep3B durchgeführt wurden (Kaufmann et al. 2007). Durch Kaufmann et al. wird nicht nur demonstriert, dass die Thrombinrezeptoren PAR₁ und PAR₄ in permanenten Zelllinien und in primären Zellkulturen des HCCs exprimiert werden, sondern auch, dass Thrombin über diese eine Steigerung der Migration von HCC-Zellen vermittelt.

Eine Beeinflussung der Migrationsrate durch proliferative Effekte wurde bereits in vorangegangenen analogen Experimenten der Arbeitsgruppe Kaufmann unter Verwendung des Proliferationsinhibitors Mitomycin ausgeschlossen.

Insgesamt ist eine Beteiligung der Proteinase-aktivierten Rezeptoren in der Tumorprogression des HCCs denkbar, da die Zellmotilität nach der Extravasation als kritisch während metastatischer Prozesse im Leberkrebs erachtet wird (Hangan et al. 1996). Im Falle des hepatozellulären Karzinoms handelt es sich somit um eine weitere Tumorentität, bei der die Zellmotilität durch den Einfluss von PAR-Agonisten stimuliert wird. Auch in der Zelllinie A-489 des Nierenzellkarzinoms agiert Thrombin über PKA-abhängige Mechanismen als Regulator der Zellmigration (Kaufmann et al. 2002). Ebenso führt eine PAR₁-vermittelte EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) -Transaktivierung zu einer Migrationssteigerung im Nierenzellkarzinom (Bergmann et al. 2006). Auch im Kolonkarzinom wird eine PAR₁-stimulierte Migrationssteigerung beobachtet (Heider et al. 2004). Insgesamt wird deutlich, dass insbesondere die Proteinase-aktivierten Rezeptoren eine wichtige Rolle bezüglich der Thrombin-vermittelten Migration spielen (Shi et al. 2004) und dass verschiedene Signalwege an den Effekten beteiligt sind. Somit wird neben der PAR₁-vermittelten Transaktivierung von EGFR (Bergmann et al. 2006) eine RhoA-vermittelte Reorganisation des Zytoskeletts in

LNCaP-Zellen des Prostatakarzinoms beschrieben (Greenberg et al. 2003). Des Weiteren wird durch Thrombin hochreguliertes Cathepsin D mit einer gesteigerten Migration von Tumorzellen in Zusammenhang gebracht (Hu et al. 2008).

In einem weiteren Versuch wurde der Einfluss des BMP-Systems auf Aktivitätsebene bzw. im biologischen System genauer analysiert. Hierfür wurde rhBMP-2 in verschiedenen Konzentrationen (10, 50 und 100 ng/ml) als mögliches chemoattraktives Agens eingesetzt. Der Versuch ergab, dass rhBMP-2 eine konzentrationsabhängige, signifikante Steigerung der Migration von Hep3B-Zellen durch eine Polycarbonatmembran nach 24h bewirkt. Beginnende Zellproliferationseffekte, die zu einer Verfälschung der Migrationsdaten geführt hätten, sind hierbei nach 24h unwahrscheinlich. In einer Vielzahl von verschiedenen Zelltypen wurde gezeigt, dass BMP-2 antiproliferativ wirkt (Ghosh-Choudhury et al. 2000). Somit wurden antiproliferative Effekte von rhBMP-2 unter anderem für Prostatakarzinomzellen, für humane Myelomazellen, für Brustkrebszellen, für Kolonkarzinome und für Medulloblastome beschrieben (Ide et al. 1997, Kawamura et al. 2000, Ghosh-Choudhury et al. 2000, Hallahan et al. 2003, Kodach et al. 2007).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird somit demonstriert, dass die Migrationsfähigkeit der humanen HCC-Zelllinie Hep3B ebenso durch rhBMP-2 nach 24h stimuliert werden kann. Dabei handelt es sich um einen tumorigenen Effekt von BMP-2, der bereits in einer Vielzahl anderer Malignome beobachtet wurde. So führt BMP-2 im Chondrosarkom über eine Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs zu einer gesteigerten Migrationsrate der Tumorzellen (Fong et al. 2008). BMP-2 bewirkt in Zellen des Prostatakarzinoms über eine Aktivierung von Integrinen eine Migrationssteigerung (Lai et al. 2008) und führt in der Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7 zu einer erhöhten Invasivität in-vitro (Clement et al. 2005). Auch haben weitere Studien gezeigt, dass BMP-2 eine bedeutende Rolle während der Migration von Krebszellen spielt, einschließlich in Lungentumoren und im Melanom (Langenfeld et al. 2003, Rothhammer et al. 2005). Basierend auf diesen Kenntnissen könnte es sich bei der BMP-2-stimulierten Migrationssteigerung um eine allgemeine protumorigene Eigenschaft des BMP-2 handeln. Ebenso liegt die Vermutung nahe, dass BMP-2 die Metastasierung verschiedener Tumorentitäten, einschließlich des hepatozellulären Karzinoms, über eine Erhöhung der Migrationsrate fördert. Welcher Mechanismus der Migrationssteigerung im HCC zugrunde liegt, ist hierbei jedoch noch nicht eindeutig. BMP-2 vermittelt seine migrationsstimulierende Wirkung über vielfältige Mechanismen, welche oben bereits angedeutet sind. Ähnliche Signalwege könnten auch im HCC beteiligt sein und über eine, für

C2C12-Zellen bereits beschriebene, induzierte Reorganisation des Aktinzytoskeletts (Gamell et al. 2008) die Motilität von humanen HCC-Zellen begünstigen.

Die stimulierende Wirkung von Thrombin, der PAR-Agonisten und von rhBMP-2 auf die Migration von Hep3B-Zellen konnte in vorherigen Versuchen also bewiesen werden. In einem weiteren Versuch wurden die Substanzen daher kombiniert eingesetzt, um eventuelle additive Effekte auf die Zellmigration zu analysieren. Da 100 ng/ml rhBMP-2 in gleicher Weise wie Thrombin die Migration steigern, wurde diese Konzentration in Kombination mit Thrombin (1,0 NIH-U/ml) und mit dem PAR₁-Agonisten (100 µM) eingesetzt. Dabei konnte kein additiver Effekt beobachtet werden. Dies lässt einen gemeinsamen intrazellulären Endpunkt der BMP-Signalkaskade und des Thrombin-/PAR-Pathways bzw. eine Vereinigung der durch unterschiedliche Rezeptoren vermittelten Signale mit Erreichen eines zellulären Maximaleffektes vermuten. Dabei ist die weitere Identifizierung möglicher „crossing-points“ von großer Bedeutung.

In weiteren Migrationsversuchen wurde anschließend analysiert, ob die durch Thrombin oder durch das PAR₁-aktivierende bzw. PAR₄-aktivierende Peptid stimulierte Migration von Hep3B-Zellen durch Komponenten des BMP-Systems beeinflusst werden kann. Dabei wurde das Versuchsdesign zur Identifikation möglicher Interaktionen beider Signalwege so gewählt, dass die BMP-Signalkaskade verändert wurde, während die Behandlung der Zellen mit Thrombin oder des PAR-Agonisten gleich blieb. Dabei kam es zum Einsatz von rhNoggin, einem generellen BMP-Inhibitor, und rhALK3, der löslichen, extrazellulären Domäne des BMP-Rezeptors IA. Während die Zellmigration durch den alleinigen Einsatz von rhNoggin signifikant gesteigert wird, kommt es durch einen kombinierten Einsatz von rhNoggin und Thrombin bzw. des PAR₁/PAR₄-Agonisten zu einer signifikanten Abnahme der vorher stimulierten Zellmigration von Hep3B-Zellen nach 24h. Dabei ist es am naheliegendsten, dass Noggin alleine als extrazellulärer BMP-Inhibitor die Wirkung inhibitorischer BMPs blockiert und die Rezeptorwirkung nicht inhibitorischer BMPs verstärkt, über welche eine Zellmigration vermittelt wird. Bei einer Kombination mit Thrombin oder der PAR-Agonisten findet sich eine Abnahme der Thrombin-induzierten oder durch die PAR-Agonisten gesteigerten Zellmigration. Dieser Effekt könnte durch eine mögliche extrazelluläre Wirkung des Noggins und eine direkte Interaktion mit Thrombin vermittelt sein. Es ist jedoch auch vorstellbar, dass direkte Interaktionen zwischen Noggin und den Proteinase-aktivierten Rezeptoren zu einer Modulation der Thrombin-induzierten Signalkaskade und zu zellphysiologischen Veränderungen führen. Weiterhin ist zu berücksichtigen, dass Thrombin als Serinprotease auch rezeptorunabhängige Prozesse durch katalytische Spaltung auslösen

kann und diese durch Noggin beeinflusst werden könnten. Weiterhin ist nicht ausgeschlossen, dass eine durch Noggin vermittelte BMP-Inhibition, einhergehend mit einer Herunterregulation der BMP-Rezeptor-Aktivität und einer Signalabnahme, für derartige Veränderungen verantwortlich ist.

Zusammenfassend deutet die Interferenz von Noggin, einer Komponente des BMP-Signalwegs, mit der Thrombin-/PAR-stimulierten Zellmigration auf komplexe molekulare Interaktionen beider Signalwege hin. Hierbei sei kurz erwähnt, dass der Einsatz von rhALK3, der löslichen extrazellulären Domäne des Typ-1-BMP-Rezeptors, sowohl alleine als auch vor allem in Kombination mit Thrombin mit einer Migrationssteigerung zu einem gegensätzlichen Effekt führt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird demonstriert, dass der Einsatz extrazellulärer Effektoren, einschließlich der Proteinase-aktivierten Rezeptoren und rhNoggin, Einfluss auf die Zellmigration, einen komplexen, zellphysiologischen Vorgang, besitzt. Während zur Beurteilung möglicher Interaktionen des BMP-Signalwegs und des Thrombin-/PAR-Pathways das Thrombin-/PAR-System durch Inkubation mit entsprechenden Substanzen in den kombinierten Versuchsansätzen gleich gewählt wurde, fand eine Modulation des BMP-Systems statt. Die Hemmung der Thrombin- und PAR-stimulierten Zellmigration von Hep3B Zellen durch den kombinierten Einsatz mit rhNoggin, einem extrazellulären BMP-Inhibitor, deutet auf komplexe molekulare Interaktionen beider Signalkaskaden hin.

Basierend auf dieser Beobachtung wurde die Fragestellung weiterentwickelt. Hierbei galt es zu klären, ob sich durch die direkte Blockade des BMP-Rezeptors gleiche Effekte auf zellphysiologischer Ebene ergeben. Für ein besseres Verständnis dieser, durch ein Mitglied der BMP-Familie vermittelten Wirkung auf die Migration von Hep3B-Zellen wurde Dorsomorphin in folgenden Untersuchungen als mögliche migrationsmodifizierende Substanz eingesetzt. Dorsomorphin blockt BMP-Signale, indem es die Typ-1-BMP-Rezeptoren Alk2, Alk3 und Alk6 hemmt. Dies wiederum führt zur einer Blockade der BMP-vermittelten Smad1/5/8-Phosphorylation und der Transkription von Zielgenen (Yu et al. 2008). Auf Grundlage dessen wurde untersucht, ob Dorsomorphin mit rhNoggin vergleichbare, nun rezeptorvermittelte Effekte auf die Migration von Hep3B-Zellen bewirkt.

Als Ergebnis wird gezeigt, dass der Einsatz von Dorsomorphin einen mit Noggin vergleichbaren Effekt, eine Migrationshemmung, erzielt. Dabei ist das Phänomen der Migrationshemmung nicht nur bei der Thrombin-stimulierten Zellmigration zu finden, sondern tritt auch bei der durch PAR₁-gesteigerten Zellmotilität auf. Interessant ist nun die Feststellung, dass die Migrationshemmung sowohl durch den auf extrazellulärer Ebene

wirkenden BMP-Inhibitor Noggin als auch durch die auf Rezeptorebene wirkende Substanz Dorsomorphin hervorgerufen wird. Dabei gilt jedoch weiterhin zu klären, ob Interaktionen beider Signalsysteme durch die Modulation der BMP-Rezeptoraktivität oder durch nachfolgende Veränderungen der intrazellulären Signalweiterleitung beider Systeme zustande kommen.

Auf Grundlage dessen wurde in nachfolgenden Experimenten überprüft, ob Dorsomorphin zu einer geänderten Aktivierung von Signalwegen führt. Für die Identifizierung veränderter, intrazellulärer Signalmoleküle, die an der Vermittlung der beobachteten Effekte möglicherweise beteiligt sind, wurden Untersuchungen auf Proteinebene durchgeführt. Dafür wurden Hep3B-Zellen für 24h mit unterschiedlichen Konzentrationen an Dorsomorphin (2, 5, 10 μ M) und mit rhBMP-2 (100 ng/ml) als Positivkontrolle inkubiert. Als Negativkontrolle (sf) wurde ein Teil der Zellen nicht stimuliert. Es wurde eine Inkubationszeit von 24h gewählt, um die Ergebnisse vorangegangener Migrationsversuche verifizieren zu können. Die Blots wurden mit dem Programm AIDA Image Analyser 3.52 ausgewertet.

Um zunächst die Aktivität des in den Migrationsexperimenten eingesetzten Dorsomorphins, das eine Hemmung der Phosphorylierung von Smad1/5/8 (Yu et al. 2008) bewirkt, selbst zu bestimmen, wurden spezifische Antikörper gegen Smad1/5/8 eingesetzt. Durch die mit Dorsomorphin erzielte konzentrationsabhängige Hemmung der Phosphorylierung des untersuchten Proteins, wie sie auch in der Literatur beschrieben ist, konnte die Aktivität der eingesetzten Substanz bestätigt werden.

In weiteren Untersuchungen wurde anschließend der Phosphorylierungsstatus unterschiedlicher, intrazellulärer Signalmoleküle nach Einsatz von Dorsomorphin zur Identifizierung möglicher „crossing-points“ des BMP-Signalswegs und des Thrombin-/PAR-Pathways ermittelt. Bei der p44/42 MAP-Kinase, die ein „downstream“-Molekül der Thrombin-/PAR-Signalkaskade darstellt, führt Dorsomorphin zu einer konzentrationsabhängigen Steigerung der Phosphorylierung. Im Gegensatz dazu bleibt der Phosphorylierungsstatus von Akt, einem „downstream“-Molekül beider Signalwege, und der p38 MAP-Kinase unbeeinflusst. Auf Grundlage der Ergebnisse könnte es sich bei der p44/42 MAP-Kinase um einen möglichen „crossing-point“ beider Signalsysteme handeln, jedoch sind weitere Untersuchungen essentiell, um diese Aussage zu stärken.

In einer folgenden Untersuchung wurde analysiert, ob die durch Dorsomorphin bewirkte Blockade des Typ-1-BMP-Rezeptors eine weitere Signaltransduktionskaskade beeinflusst, die in Zusammenhang mit Thrombin aktiviert wird. Durch die Bindung des Hepatocyte Growth Factors (HGF), bei dem es sich um den natürlichen Liganden handelt, werden über den Met-

Rezeptor multiple biologische Funktionen wie Zellproliferation, Invasion, Migration, Morphogenese und Überleben epithelialer Zellen reguliert (Birchmeier et al. 2003, Zhang und Vande Woude 2003, Rosario und Birchmeier 2003). Dabei wirkt Met nicht nur als eigenständiges System, sondern stellt auch ein Ziel des Thrombinsignalwegs dar.

Die Untersuchungen ergaben dabei einen sehr interessanten, konzentrationsabhängigen Phosphorylierungsstatus. Während die Phosphorylierung durch den Einsatz niedriger Dorsomorphinkonzentrationen auf das 13-fache gesteigert wird, fällt die Zunahme der Phosphorylierung von Met nach Einsatz höherer Konzentrationen von Dorsomorphin geringer aus. Eine Beurteilung dieses eindrucksvollen Ergebnisses ist an dieser Stelle noch nicht möglich und verlangt weitere Untersuchungen. Die Annahme von unter Umständen auf Proteinebene stattfindenden Interaktionen des BMP- und des Thrombin-Systems wird auf Grundlage dieser Beobachtungen jedoch zusätzlich bestärkt.

Zusammenfassend ergeben sich aus den Ergebnissen der Migrationsexperimente als auch aus den Ergebnissen der Aktivitätsuntersuchungen verschiedener Signalwege interessante Phänomene. Diese beeinflussen durch die Interferenz des BMP-Signalwegs mit der Thrombin-stimulierten Migration nicht nur die Zellmigration als einen komplexen, zellphysiologischen Vorgang. Vielmehr spiegeln sich Veränderungen auch auf zellbiologischer Ebene, z. B. auch im Phosphorylierungsstatus von Met, wieder. Diese, im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse bestärken die Hypothese von Interaktionen beider Signalsysteme.

Letztendlich stellt sich die Frage nach Verknüpfungspunkten des BMP-Signalwegs und der Thrombin-/PAR-Signalkaskade, die für derartige Veränderungen verantwortlich sein können. Eine Vielzahl intrazellulärer Signalmoleküle besitzen Funktionen während der Zellmigration, einschließlich MAP-Kinasen, Lipidkinasen, Phospholipasen, Serin-/Threoninkinasen und Tyrosinkinasen. Dabei spielt die Familie der Rho-GTPasen eine bedeutungsvolle Rolle in der Regulation biochemischer Signalwege, die die Zellmigration induzieren (Raftopoulou und Hall 2004)

Bezüglich der Ergebnisse der vorliegenden Promotionsarbeit fällt bei einem direkten Vergleich beider Signalsysteme auf, dass mit Rho und ebenso mit der PI3-Kinase (PI3K, Phosphatidylinositol-3-Kinase) gleiche intrazelluläre Effektormoleküle eine Bedeutung bei der Signalweiterleitung sowohl der BMP-Signale als auch der PAR-Signale haben und mögliche Schnittstellen für einen „cross-talk“ darstellen könnten. Sowohl Rho als auch die PI3K modulieren die Reorganisation des Aktinzytoskeletts und spielen folglich eine Rolle bei migratorischen Prozessen.

Von der kleinen GTPase Rho ist bekannt, dass sie bei einer Vielzahl zellulärer Funktionen, einschließlich Zelladhäsion, zellulärer Motilität und Migration, Zellwachstum, Zellkontraktion und Zytokinese, eine Rolle spielt (Wettschureck und Offermanns 2002). Die Beteiligung der Rho-Familie an der Organisation des Aktinzytoskeletts wurde ausführlich in Swiss3T3-Fibroblasten analysiert, bei denen Rho die Formation kontraktile Aktin-Myosin-Filamente reguliert (Ridley und Hall 1992). Rho-vermittelte, zelluläre Prozesse sind ebenso an der Migration und Invasion von Tumorzellen beteiligt. Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von RhoA oder der Rho-Kinase die Invasivität von kultivierten Leberzellen der Ratte steigert, während eine Inhibition der Rho-Kinase durch dominant-negative Mutanten oder Inhibitoren sowohl Tumorstadium als auch Metastasierung in verschiedenen Modellen reduzierten (Wettschureck und Offermanns 2002). Seasholtz et al. beschreiben Rho als einen kritischen Mediator von Thrombineffekten auf die DNA-Synthese und Zellmigration glatter Muskelzellen (Seasholtz et al. 1999). Weiterhin wurde unter anderem in LNCaP-Zellen des Prostatakarzinoms eine RhoA-vermittelte Reorganisation des Zytoskeletts dargestellt (Greenberg et al. 2003). Bezüglich der untersuchten Interaktionen des BMP-Signalwegs und des Thrombin-/PAR-Pathways ergeben sich aus den Rho-vermittelten, zellulären Prozessen in beiden Signalkaskaden mögliche Gemeinsamkeiten. Dies könnte ein denkbarer Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen sein und zur weiteren Erklärung der in der Arbeit dargestellten Migrationsergebnisse beitragen.

Als weiterer möglicher „crossing-point“ des BMP-Signalwegs und des Thrombin-/PAR-Signalsystems kommt die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) in Betracht. Die PI3K, eine Familie von Enzymen mit multifunktionalen Aufgaben, wird durch eine Vielzahl von Faktoren aktiviert und kontrolliert die Aktivität multipler „downstream“ Effektoren. Sie wird durch Rezeptor- und Nichtrezeptor-Tyrosinkinasen sowie durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren aktiviert und koordiniert verschiedene zelluläre Effekte (Goncharova et al. 2002). Die PI3K wurde neben Rho als eine weitere Komponente identifiziert, die an der Reorganisation des Aktinzytoskeletts und der Zellmigration beteiligt ist (Jimenez et al. 2000). Dabei wird das durch die PI3K induzierte Remodelling der Aktinfilamente als essentiell während der Zellmigration angesehen (Qian et al. 2004). Verschiedene Analysen zeigten, dass die PI3K sowohl durch Thrombin (Cao et al. 2006, Feutz et al. 2008) als auch durch BMP-2 (Gamell et al. 2008) aktiviert wird. Dabei führt BMP-2 im Chondrosarkom über eine Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs zu einer gesteigerten Migrationsrate der Tumorzellen (Fong et al. 2008) und begünstigt ebenso in C2C12-Zellen über eine Reorganisation des Aktinzytoskeletts, abhängig von der Aktivität von Cdc42 und einer α -Isoform der PI3K, die

Motilität von humanen HCC-Zellen (Gamell et al. 2008). Ebenso führt Thrombin über eine Stimulation des PI3K/Akt-Signalwegs zu einer gesteigerten Motilität unterschiedlicher Zelltypen (Goncharova et al. 2002, Gordon et al. 2009, Cao et al. 2006, Feutz et al. 2008). Die PI3K-vermittelte Migrationssteigerung stellt somit eine weitere Gemeinsamkeit der beiden, im Rahmen der Promotionsarbeit untersuchten Signalwege dar und könnte ein möglicher „crossing-point“ für Interaktionen sein. Somit bilden Rho und die PI3K als mögliche Vermittler intrazellulärer Interaktionen zwischen dem BMP-Signalweg und des Thrombin-/PAR-Signalkaskade Ansatzpunkte für weitere experimentelle Untersuchungen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit liefern bereits Hinweise auf Interaktionen beider Signalwege.

Ausblick:

Hinsichtlich der in den Migrations-Assays und den Western Blots gewählten Untersuchungszeit von 24h sollte in weiteren Experimenten der Parameter „Zeit“ zur Beurteilung der Effekte in den Migrationsversuchen als auch des Phosphorylierungsstatus verschiedener intrazellulärer Signalmoleküle modifiziert werden. Dies könnte unter anderem zu einem besseren Verständnis des interessanten Phosphorylierungsstatus von Met beitragen. Eine durch BMP-2 bedingte Regulation von Phosphatasen, zum Beispiel der Protein-Phosphatase 2A (pp2A) (Bengtsson et al. 2009), und Kinasen ist hierbei als Ursache der beobachteten Effekte auf die Met-Phosphorylierung ebenfalls nicht ausgeschlossen. Die Formation von Clustern aus Thrombinrezeptoren, Met und/oder BMP-Rezeptoren, wie es für letztere bereits beschrieben wurde (Nohe et al. 2003), und eine gegenseitige, durch Rezeptoraktivierung bedingte Konformationsänderung als weitere Ursache des hier vorliegenden Met-Phosphorylierungsstatus nach Inkubation von Hep3B-Zellen mit Dorsomorphin könnte eine Grundlage für künftige experimentelle Ansätze bilden.

Für die weitere Charakterisierung der Interferenz der Thrombin-/PAR-gesteigerten Migration von Hep3B-Zellen mit Mitgliedern des BMP-Netzwerkes, die mit Noggin und Dorsomorphin sowohl auf extrazellulärer als auch auf Rezeptorebene bereits erzielt wurde, ergibt sich mit dem Einsatz von Smad-spezifischer siRNA ein zusätzlicher experimenteller Versuchsaufbau. Durch diesen könnten denkbare, nun intrazelluläre und unter Umständen Smad-vermittelte Interaktionen beider Signalwege analysiert werden. Außerdem ist auch die Aktivierung von Smad-unabhängigen Effekten als Ursache der Interaktionen denkbar.

Da der Aussagewert von Ergebnissen, die nur an einer Zelllinie erarbeitet sind, relativ begrenzt ist, sollten schließlich die vorliegenden Ergebnisse durch Untersuchungen an einer weiteren permanenten Zelllinie des HCCs bestätigt werden.

Schlussfolgerung

In der vorliegenden Arbeit wird erstmals gezeigt, dass etablierte humane Zelllinien des HCCs alle notwendigen Komponenten für ein aktives BMP-Signaling, einschließlich inhibitorische BMPs und negativ regulatorische BMP-Inhibitoren, exprimieren. Dies lässt eine Beteiligung von Mitgliedern des BMP-Netzwerkes an der Entstehung und Progression des hepatozellulären Karzinoms vermuten.

Interaktionen des BMP-Systems und des Thrombin-/PAR-Systems konnten auf Transkriptionsebene nicht nachgewiesen werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird demonstriert, dass der Einsatz extrazellulärer Effektoren, einschließlich der Proteinase-aktivierten Rezeptoren, rhBMP-2 und rhNoggin, Einfluss auf die Zellmigration, einen komplexen, zellphysiologischen und tumorbiologisch bedeutsamen Vorgang, besitzen. Dabei deutet die Hemmung der Thrombin- und PAR-stimulierten Zellmigration von Hep3B Zellen durch den kombinierten Einsatz von rhNoggin, einem extrazellulären BMP-Inhibitor, und Dorsomorphin, einer auf Rezeptorebene wirkenden Substanz, auf komplexe molekulare Interaktionen beider Signalkaskaden hin.

Die Phänomene der Interferenz spiegeln sich ebenso nach Einfluss von Dorsomorphin in Veränderungen auf zellbiologischer Ebene, z. B. im Phosphorylierungsstatus von Met, wieder. Sowohl Met als auch die p44/42 MAP-Kinase könnten mögliche „crossing-points“ beider Signalsysteme darstellen, jedoch sind weitere Untersuchungen essentiell, um diese Aussage zu stärken. Sowohl Rho als auch die PI3K, mögliche Vermittler intrazellulärer Interaktionen zwischen dem BMP-Signalweg und der Thrombin-/PAR-Signalkaskade, bilden Ansatzpunkte für weitere experimentelle Untersuchungen.

Zusammenfassend bestärken die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse die Hypothese von Interaktionen beider Signalsysteme. Eine genauere Identifizierung der Interaktionen beider tumorigener Signalwege könnte dabei einen neuen therapeutischen Ansatzpunkt in der Behandlung des hepatozellulären Karzinoms im Sinne einer zielgerichteten Therapie mit dem Einsatz u.a. kleiner Moleküle ermöglichen. Die Kenntnis über Wechselwirkungen von Signalwegen und den damit gegebenen Möglichkeiten zur Beeinflussung intrazellulärer Wege wird damit unerlässlich.

Literaturverzeichnis

- Alarmo EL, Parssinen J, Ketolainen JM, Savinainen K, Karhu R, Kallioniemi A. 2009. BMP7 influences proliferation, migration, and invasion of breast cancer cells. *Cancer Lett*, 275(1):35-43.
- Andrade-Gordon P, Derian CK, Maryanoff BE, Zhang HC, Addo MF, Cheung W, Damiano BP, D'Andrea MR, Darrow AL, de Garavilla L, Eckardt AJ, Giardino EC, Haertlein BJ, McComsey DF. 2001. Administration of a potent antagonist of protease-activated receptor-1 (PAR-1) attenuates vascular restenosis following balloon angioplasty in rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 298 (1):34-42.
- Arakawa M, Kage M, Sugihara S, Nakashima T, Suenaga M, Okuda K. 1986. Emergence of malignant lesions within an adenomatous hyperplastic nodule in a cirrhotic liver. Observations in five cases. *Gastroenterology*, 91 (1):198-208.
- Aravalli RN, Steer CJ, Cressman EN. 2008. Molecular mechanisms of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 48 (6):2047-2063.
- Arnold SF, Tims E, McGrath BE. 1999. Identification of bone morphogenetic proteins and their receptors in human breast cancer cell lines: importance of BMP2. *Cytokine*, 11 (12):1031-1037.
- Attisano L, Wrana JL. 2000. Smads as transcriptional co-modulators. *Curr Opin Cell Biol*, 12 (2):235-243.
- Avila MA, Berasain C, Sangro B, Prieto J. 2006. New therapies for hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, 25 (27):3866-3884.
- Benezra R, Davis RL, Lockshon D, Turner DL, Weintraub H. 1990. The protein Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. *Cell*, 61 (1):49-59.
- Bengtsson L, Schwappacher R, Roth M, Boergermann JH, Hassel S, Knaus P. 2009. PP2A regulates BMP signalling by interacting with BMP receptor complexes and by dephosphorylating both the C-terminus and the linker region of Smad1. *J Cell Sci*, 122 (Pt 8):1248-1257.
- Berger P, Tunon-De-Lara JM, Savineau JP, Marthan R. 2001. Selected contribution: tryptase-induced PAR-2-mediated Ca(2+) signaling in human airway smooth muscle cells. *J Appl Physiol*, 91 (2):995-1003.
- Bergmann S, Junker K, Henklein P, Hollenberg MD, Settmacher U, Kaufmann R. 2006. PAR-type thrombin receptors in renal carcinoma cells: PAR1-mediated EGFR activation promotes cell migration. *Oncol Rep*, 15 (4):889-893.
- Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E, Vande Woude GF. 2003. Met, metastasis, motility and more. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4 (12):915-925.

- Black PC, Mize GJ, Karlin P, Greenberg DL, Hawley SJ, True LD, Vessella RL, Takayama TK. 2007. Overexpression of protease-activated receptors-1,-2, and-4 (PAR-1, -2, and -4) in prostate cancer. *Prostate*, 67 (7):743-756.
- Bleuming SA, He XC, Kodach LL, Hardwick JC, Koopman FA, Ten Kate FJ, van Deventer SJ, Hommes DW, Peppelenbosch MP, Offerhaus GJ, Li L, van den Brink GR. 2007. Bone morphogenetic protein signaling suppresses tumorigenesis at gastric epithelial transition zones in mice. *Cancer Res*, 67 (17):8149-8155.
- Boige V, Laurent-Puig P, Fouchet P, Flejou JF, Monges G, Bedossa P, Bioulac-Sage P, Capron F, Schmitz A, Olschwang S, Thomas G. 1997. Concerted nonsyntenic allelic losses in hyperploid hepatocellular carcinoma as determined by a high-resolution allelotype. *Cancer Res*, 57 (10):1986-1990.
- Boire A, Covic L, Agarwal A, Jacques S, Sherifi S, Kuliopulos A. 2005. PAR1 is a matrix metalloprotease-1 receptor that promotes invasion and tumorigenesis of breast cancer cells. *Cell*, 120 (3):303-313.
- Bolanos-Garcia VM. 2005. MET meet adaptors: functional and structural implications in downstream signalling mediated by the Met receptor. *Mol Cell Biochem*, 276 (1-2):149-157.
- Bosch FX, Ribes J, Borrás J. 1999. Epidemiology of primary liver cancer. *Semin Liver Dis*, 19 (3):271-285.
- Bosch FX, Ribes J, Cleries R, Diaz M. 2005. Epidemiology of hepatocellular carcinoma. *Clin Liver Dis*, 9 (2):191-211, v.
- Bretschneider E, Kaufmann R, Braun M, Nowak G, Glusa E, Schror K. 2001. Evidence for functionally active protease-activated receptor-4 (PAR-4) in human vascular smooth muscle cells. *Br J Pharmacol*, 132 (7):1441-1446.
- Breuhahn K, Longerich T, Schirmacher P. 2006. Dysregulation of growth factor signaling in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, 25 (27):3787-3800.
- Buresi MC, Buret AG, Hollenberg MD, MacNaughton WK. 2002. Activation of proteinase-activated receptor 1 stimulates epithelial chloride secretion through a unique MAP kinase- and cyclo-oxygenase-dependent pathway. *FASEB J*, 16 (12):1515-1525.
- Camerer E, Kataoka H, Kahn M, Lease K, Coughlin SR. 2002. Genetic evidence that protease-activated receptors mediate factor Xa signaling in endothelial cells. *J Biol Chem*, 277 (18):16081-16087.
- Canalis E, Economides AN, Gazzerro E. 2003. Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. *Endocr Rev*, 24 (2):218-235.
- Cao H, Dronadula N, Rao GN. 2006. Thrombin induces expression of FGF-2 via activation of PI3K-Akt-Fra-1 signaling axis leading to DNA synthesis and motility in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 290 (1):C172-182.

- Caruso R, Pallone F, Fina D, Gioia V, Peluso I, Caprioli F, Stolfi C, Perfetti A, Spagnoli LG, Palmieri G, Macdonald TT, Monteleone G. 2006. Protease-activated receptor-2 activation in gastric cancer cells promotes epidermal growth factor receptor trans-activation and proliferation. *Am J Pathol*, 169 (1):268-278.
- Cassar L, Li H, Pinto AR, Nicholls C, Bayne S, Liu JP. 2008. Bone morphogenetic protein-7 inhibits telomerase activity, telomere maintenance, and cervical tumor growth. *Cancer Res*, 68 (22):9157-9166.
- Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. 2002. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer*, 2 (8):563-572.
- Chan AM, King HW, Deakin EA, Tempest PR, Hilkens J, Kroezen V, Edwards DR, Wills AJ, Brookes P, Cooper CS. 1988. Characterization of the mouse met proto-oncogene. *Oncogene*, 2 (6):593-599.
- Christiansen JJ, Rajasekaran AK. 2006. Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis. *Cancer Res*, 66 (17):8319-8326.
- Clement JH, Marr N, Meissner A, Schwalbe M, Sebald W, Kliche KO, Hoffken K, Wolfl S. 2000. Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) induces sequential changes of Id gene expression in the breast cancer cell line MCF-7. *J Cancer Res Clin Oncol*, 126 (5):271-279.
- Clement JH, Raida M, Sanger J, Bicknell R, Liu J, Naumann A, Geyer A, Waldau A, Hortschansky P, Schmidt A, Hoffken K, Wolft S, Harris AL. 2005. Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) induces in vitro invasion and in vivo hormone independent growth of breast carcinoma cells. *Int J Oncol*, 27 (2):401-407.
- Cocks TM, Moffatt JD. 2000. Protease-activated receptors: sentries for inflammation? *Trends Pharmacol Sci*, 21 (3):103-108.
- Cooper CS, Park M, Blair DG, Tainsky MA, Huebner K, Croce CM, Vande Woude GF. 1984. Molecular cloning of a new transforming gene from a chemically transformed human cell line. *Nature*, 311 (5981):29-33.
- Coughlin SR. 2000. Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature*, 407 (6801):258-264.
- Coughlin SR. 2005. Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *J Thromb Haemost*, 3 (8):1800-1814.
- Croce CM. 2008. Oncogenes and cancer. *N Engl J Med*, 358 (5):502-511.
- Dai Z, Popkie AP, Zhu WG, Timmers CD, Raval A, Tannehill-Gregg S, Morrison CD, Auer H, Kratzke RA, Niehans G, Amatschek S, Sommergruber W, Leone GW, Rosol T, Otterson GA, Plass C. 2004. Bone morphogenetic protein 3B silencing in non-small-cell lung cancer. *Oncogene*, 23 (20):3521-3529.

- Darby S, Cross SS, Brown NJ, Hamdy FC, Robson CN. 2008. BMP-6 over-expression in prostate cancer is associated with increased Id-1 protein and a more invasive phenotype. *J Pathol*, 214 (3):394-404.
- Darmoul D, Gratio V, Devaud H, Peiretti F, Laburthe M. 2004. Activation of proteinase-activated receptor 1 promotes human colon cancer cell proliferation through epidermal growth factor receptor transactivation. *Mol Cancer Res*, 2 (9):514-522.
- Davila JA, Morgan RO, Shaib Y, McGlynn KA, El-Serag HB. 2005. Diabetes increases the risk of hepatocellular carcinoma in the United States: a population based case control study. *Gut*, 54 (4):533-539.
- Degos F, Christidis C, Ganne-Carrie N, Farmachidi JP, Degott C, Guettier C, Trinchet JC, Beaugrand M, Chevret S. 2000. Hepatitis C virus related cirrhosis: time to occurrence of hepatocellular carcinoma and death. *Gut*, 47 (1):131-136.
- Dennler S, Goumans MJ, ten Dijke P. 2002. Transforming growth factor beta signal transduction. *J Leukoc Biol*, 71 (5):731-740.
- Derian CK, Damiano BP, D'Andrea MR, Andrade-Gordon P. 2002. Thrombin regulation of cell function through protease-activated receptors: implications for therapeutic intervention. *Biochemistry (Mosc)*, 67 (1):56-64.
- Derynck R, Feng XH. 1997. TGF-beta receptor signaling. *Biochim Biophys Acta*, 1333 (2):F105-150.
- Deuffic S, Poynard T, Buffat L, Valleron AJ. 1998. Trends in primary liver cancer. *Lancet*, 351 (9097):214-215.
- Ducy P, Karsenty G. 2000. The family of bone morphogenetic proteins. *Kidney Int*, 57 (6):2207-2214.
- El-Serag HB. 2002. Hepatocellular carcinoma: an epidemiologic view. *J Clin Gastroenterol*, 35 (5 Suppl 2):S72-78.
- El-Serag HB, Mason AC. 1999. Rising incidence of hepatocellular carcinoma in the United States. *N Engl J Med*, 340 (10):745-750.
- El-Serag HB, Davila JA, Petersen NJ, McGlynn KA. 2003. The continuing increase in the incidence of hepatocellular carcinoma in the United States: an update. *Ann Intern Med*, 139 (10):817-823.
- Even-Ram S, Uziely B, Cohen P, Grisaru-Granovsky S, Maoz M, Ginzburg Y, Reich R, Vlodavsky I, Bar-Shavit R. 1998. Thrombin receptor overexpression in malignant and physiological invasion processes. *Nat Med*, 4 (8):909-914.
- Faruqi TR, Weiss EJ, Shapiro MJ, Huang W, Coughlin SR. 2000. Structure-function analysis of protease-activated receptor 4 tethered ligand peptides. Determinants of specificity and utility in assays of receptor function. *J Biol Chem*, 275 (26):19728-19734.

- Feitelson MA, Sun B, Satiroglu Tufan NL, Liu J, Pan J, Lian Z. 2002. Genetic mechanisms of hepatocarcinogenesis. *Oncogene*, 21 (16):2593-2604.
- Feutz AC, Barrandon Y, Monard D. 2008. Control of thrombin signaling through PI3K is a mechanism underlying plasticity between hair follicle dermal sheath and papilla cells. *J Cell Sci*, 121 (Pt 9):1435-1443.
- Fong YC, Li TM, Wu CM, Hsu SF, Kao ST, Chen RJ, Lin CC, Liu SC, Wu CL, Tang CH. 2008. BMP-2 increases migration of human chondrosarcoma cells via PI3K/Akt pathway. *J Cell Physiol*, 217 (3):846-855.
- Fujimoto D, Hirono Y, Goi T, Katayama K, Hirose K, Yamaguchi A. 2006. Expression of protease activated receptor-2 (PAR-2) in gastric cancer. *J Surg Oncol*, 93 (2):139-144.
- Fujiwara M, Jin E, Ghazizadeh M, Kawanami O. 2005. Activation of PAR4 induces a distinct actin fiber formation via p38 MAPK in human lung endothelial cells. *J Histochem Cytochem*, 53 (9):1121-1129.
- Furge KA, Zhang YW, Vande Woude GF. 2000. Met receptor tyrosine kinase: enhanced signaling through adapter proteins. *Oncogene*, 19 (49):5582-5589.
- Gamell C, Osses N, Bartrons R, Ruckle T, Camps M, Rosa JL, Ventura F. 2008. BMP2 induction of actin cytoskeleton reorganization and cell migration requires PI3-kinase and Cdc42 activity. *J Cell Sci*, 121 (Pt 23):3960-3970.
- Gao CF, Vande Woude GF. 2005. HGF/SF-Met signaling in tumor progression. *Cell Res*, 15 (1):49-51.
- Gerszten RE, Chen J, Ishii M, Ishii K, Wang L, Nanevich T, Turck CW, Vu TK, Coughlin SR. 1994. Specificity of the thrombin receptor for agonist peptide is defined by its extracellular surface. *Nature*, 368 (6472):648-651.
- Ghio P, Cappia S, Selvaggi G, Novello S, Lausi P, Zecchina G, Papotti M, Borasio P, Scagliotti GV. 2006. Prognostic role of protease-activated receptors 1 and 4 in resected stage IB non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer*, 7 (6):395-400.
- Ghosh-Choudhury N, Woodruff K, Qi W, Celeste A, Abboud SL, Ghosh Choudhury G. 2000. Bone morphogenetic protein-2 blocks MDA MB 231 human breast cancer cell proliferation by inhibiting cyclin-dependent kinase-mediated retinoblastoma protein phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun*, 272 (3):705-711.
- Giordano S, Ponzetto C, Di Renzo MF, Cooper CS, Comoglio PM. 1989. Tyrosine kinase receptor indistinguishable from the c-met protein. *Nature*, 339 (6220):155-156.
- Gobbi G, Sangiorgi L, Lenzi L, Casadei R, Canaider S, Strippoli P, Lucarelli E, Ghedini I, Donati D, Fabbri N, Warzecha J, Yeoung C, Helman LJ, Picci P, Carinci P. 2002. Seven BMPs and all their receptors are simultaneously expressed in osteosarcoma cells. *Int J Oncol*, 20 (1):143-147.

- Goncharova EA, Ammit AJ, Irani C, Carroll RG, Eszterhas AJ, Panettieri RA, Krymskaya VP. 2002. PI3K is required for proliferation and migration of human pulmonary vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 283 (2):L354-363.
- Gordon KJ, Kirkbride KC, How T, Blobe GC. 2009. Bone morphogenetic proteins induce pancreatic cancer cell invasiveness through a Smad1-dependent mechanism that involves matrix metalloproteinase-2. *Carcinogenesis*, 30 (2):238-248.
- Gordon SC, Bayati N, Silverman AL. 1998. Clinical outcome of hepatitis C as a function of mode of transmission. *Hepatology*, 28 (2):562-567.
- Greenberg DL, Mize GJ, Takayama TK. 2003. Protease-activated receptor mediated RhoA signaling and cytoskeletal reorganization in LNCaP cells. *Biochemistry*, 42 (3):702-709.
- Greten TF, Korangy F, Manns MP, Malek NP. 2009. Molecular therapy for the treatment of hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer*, 100 (1):19-23.
- Griffin CT, Srinivasan Y, Zheng YW, Huang W, Coughlin SR. 2001. A role for thrombin receptor signaling in endothelial cells during embryonic development. *Science*, 293 (5535):1666-1670.
- Grijelmo C, Rodrigue C, Svrcek M, Bruyneel E, Hendrix A, de Wever O, Gespach C. 2007. Proinvasive activity of BMP-7 through SMAD4/src-independent and ERK/Rac/JNK-dependent signaling pathways in colon cancer cells. *Cell Signal*, 19 (8):1722-1732.
- Gui Y, Loutzenhiser R, Hollenberg MD. 2003. Bidirectional regulation of renal hemodynamics by activation of PAR1 and PAR2 in isolated perfused rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*, 285 (1):F95-104.
- Guo W, Gorlick R, Ladanyi M, Meyers PA, Huvos AG, Bertino JR, Healey JH. 1999. Expression of bone morphogenetic proteins and receptors in sarcomas. *Clin Orthop Relat Res*, (365):175-183.
- Hallahan AR, Pritchard JJ, Chandraratna RA, Ellenbogen RG, Geyer JR, Overland RP, Strand AD, Tapscott SJ, Olson JM. 2003. BMP-2 mediates retinoid-induced apoptosis in medulloblastoma cells through a paracrine effect. *Nat Med*, 9 (8):1033-1038.
- Hangan D, Uniyal S, Morris VL, MacDonald IC, von Ballestrem C, Chau T, Schmidt EE, Chambers AF, Groom AC, Chan BM. 1996. Integrin VLA-2 (alpha2beta1) function in postextravasation movement of human rhabdomyosarcoma RD cells in the liver. *Cancer Res*, 56 (13):3142-3149.
- Hansen KK, Saifeddine M, Hollenberg MD. 2004. Tethered ligand-derived peptides of proteinase-activated receptor 3 (PAR3) activate PAR1 and PAR2 in Jurkat T cells. *Immunology*, 112 (2):183-190.
- Hardwick JC, Kodach LL, Offerhaus GJ, van den Brink GR. 2008. Bone morphogenetic protein signalling in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer*, 8 (10):806-812.

- Hatakeyama S, Satoh M, Yoshimura N, Otsu T. 1994. Immunocytochemical localization of bone morphogenetic proteins (BMPs) in salivary gland pleomorphic adenoma. *J Oral Pathol Med*, 23 (5):232-236.
- Heider I, Schulze B, Oswald E, Henklein P, Scheele J, Kaufmann R. 2004. PAR1-type thrombin receptor stimulates migration and matrix adhesion of human colon carcinoma cells by a PKCepsilon-dependent mechanism. *Oncol Res*, 14 (10):475-482.
- Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. 1997. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature*, 390 (6659):465-471.
- Hepler JR, Gilman AG. 1992. G proteins. *Trends Biochem Sci*, 17 (10):383-387.
- Hogan BL. 1996. Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev*, 10 (13):1580-1594.
- Hollenberg MD. 2003. Proteinase-mediated signaling: proteinase-activated receptors (PARs) and much more. *Life Sci*, 74 (2-3):237-246.
- Hollenberg MD, Compton SJ. 2002. International Union of Pharmacology. XXVIII. Proteinase-activated receptors. *Pharmacol Rev*, 54 (2):203-217.
- Hollenberg MD, Saifeddine M, al-Ani B, Kawabata A. 1997. Proteinase-activated receptors: structural requirements for activity, receptor cross-reactivity, and receptor selectivity of receptor-activating peptides. *Can J Physiol Pharmacol*, 75 (7):832-841.
- Hollenberg MD, Saifeddine M, Al-Ani B, Gui Y. 1999. Proteinase-activated receptor 4 (PAR4): action of PAR4-activating peptides in vascular and gastric tissue and lack of cross-reactivity with PAR1 and PAR2. *Can J Physiol Pharmacol*, 77 (6):458-464.
- Hollnagel A, Oehlmann V, Heymer J, Ruther U, Nordheim A. 1999. Id genes are direct targets of bone morphogenetic protein induction in embryonic stem cells. *J Biol Chem*, 274 (28):19838-19845.
- Höpfner M, Schuppan D, Scherubl H. 2008. Growth factor receptors and related signalling pathways as targets for novel treatment strategies of hepatocellular cancer. *World J Gastroenterol*, 14 (1):1-14.
- Hsu MY, Rovinsky S, Penmatcha S, Herlyn M, Muirhead D. 2005. Bone morphogenetic proteins in melanoma: angel or devil? *Cancer Metastasis Rev*, 24 (2):251-263.
- Hu L, Roth JM, Brooks P, Luty J, Karparkin S. 2008. Thrombin up-regulates cathepsin D which enhances angiogenesis, growth, and metastasis. *Cancer Res*, 68 (12):4666-4673.
- Ide H, Yoshida T, Matsumoto N, Aoki K, Osada Y, Sugimura T, Terada M. 1997. Growth regulation of human prostate cancer cells by bone morphogenetic protein-2. *Cancer Res*, 57 (22):5022-5027.
- Ishihara H, Connolly AJ, Zeng D, Kahn ML, Zheng YW, Timmons C, Tram T, Coughlin SR. 1997. Protease-activated receptor 3 is a second thrombin receptor in humans. *Nature*, 386 (6624):502-506.

- Jahan I, Fujimoto J, Alam SM, Sato E, Sakaguchi H, Tamaya T. 2007a. Expression of protease activated receptor-2 related to angiogenesis in tumor advancement of uterine endometrial cancers. *Oncol Rep*, 17 (2):345-350.
- Jahan I, Fujimoto J, Alam SM, Sato E, Sakaguchi H, Tamaya T. 2007b. Role of protease activated receptor-2 in tumor advancement of ovarian cancers. *Ann Oncol*, 18 (9):1506-1512.
- Javelaud D, Mauviel A. 2005. Crosstalk mechanisms between the mitogen-activated protein kinase pathways and Smad signaling downstream of TGF-beta: implications for carcinogenesis. *Oncogene*, 24 (37):5742-5750.
- Jimenez C, Portela RA, Mellado M, Rodriguez-Frade JM, Collard J, Serrano A, Martinez AC, Avila J, Carrera AC. 2000. Role of the PI3K regulatory subunit in the control of actin organization and cell migration. *J Cell Biol*, 151 (2):249-262.
- Jin Y, Yang LJ. 1990. Immunohistochemical analysis of bone morphogenetic protein (BMP) in osteosarcoma. *J Oral Pathol Med*, 19 (4):152-154.
- Kahn ML, Zheng YW, Huang W, Bigornia V, Zeng D, Moff S, Farese RV, Jr., Tam C, Coughlin SR. 1998. A dual thrombin receptor system for platelet activation. *Nature*, 394 (6694):690-694.
- Kamath L, Meydani A, Foss F, Kuliopulos A. 2001. Signaling from protease-activated receptor-1 inhibits migration and invasion of breast cancer cells. *Cancer Res*, 61 (15):5933-5940.
- Kanke T, Takizawa T, Kabeya M, Kawabata A. 2005. Physiology and pathophysiology of proteinase-activated receptors (PARs): PAR-2 as a potential therapeutic target. *J Pharmacol Sci*, 97 (1):38-42.
- Katagiri T, Yamaguchi A, Komaki M, Abe E, Takahashi N, Ikeda T, Rosen V, Wozney JM, Fujisawa-Sehara A, Suda T. 1994. Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. *J Cell Biol*, 127 (6 Pt 1):1755-1766.
- Katsuno Y, Hanyu A, Kanda H, Ishikawa Y, Akiyama F, Iwase T, Ogata E, Ehata S, Miyazono K, Imamura T. 2008. Bone morphogenetic protein signaling enhances invasion and bone metastasis of breast cancer cells through Smad pathway. *Oncogene*, 27 (49):6322-6333.
- Kaufmann R, Schulze B, Krause G, Mayr LM, Settmacher U, Henklein P. 2005. Proteinase-activated receptors (PARs)--the PAR3 Neo-N-terminal peptide TFRGAP interacts with PAR1. *Regul Pept*, 125 (1-3):61-66.
- Kaufmann R, Junker U, Junker K, Nuske K, Ranke C, Zieger M, Scheele J. 2002. The serine proteinase thrombin promotes migration of human renal carcinoma cells by a PKA-dependent mechanism. *Cancer Lett*, 180 (2):183-190.

- Kaufmann R, Rahn S, Pollrich K, Hertel J, Dittmar Y, Hommann M, Henklein P, Biskup C, Westermann M, Hollenberg MD, Settmacher U. 2007. Thrombin-mediated hepatocellular carcinoma cell migration: cooperative action via proteinase-activated receptors 1 and 4. *J Cell Physiol*, 211 (3):699-707.
- Kaushal V, Kohli M, Dennis RA, Siegel ER, Chiles WW, Mukunyadzi P. 2006. Thrombin receptor expression is upregulated in prostate cancer. *Prostate*, 66 (3):273-282.
- Kawabata M, Imamura T, Inoue H, Hanai J, Nishihara A, Hanyu A, Takase M, Ishidou Y, Udagawa Y, Oeda E, Goto D, Yagi K, Kato M, Miyazono K. 1999. Intracellular signaling of the TGF-beta superfamily by Smad proteins. *Ann N Y Acad Sci*, 886:73-82.
- Kawamura C, Kizaki M, Yamato K, Uchida H, Fukuchi Y, Hattori Y, Koseki T, Nishihara T, Ikeda Y. 2000. Bone morphogenetic protein-2 induces apoptosis in human myeloma cells with modulation of STAT3. *Blood*, 96 (6):2005-2011.
- Kew MC. 2002. Epidemiology of hepatocellular carcinoma. *Toxicology*, 181-182:35-38.
- Kleeff J, Maruyama H, Ishiwata T, Sawhney H, Friess H, Buchler MW, Korc M. 1999. Bone morphogenetic protein 2 exerts diverse effects on cell growth in vitro and is expressed in human pancreatic cancer in vivo. *Gastroenterology*, 116 (5):1202-1216.
- Kodach LL, Bleuming SA, Peppelenbosch MP, Hommes DW, van den Brink GR, Hardwick JC. 2007. The effect of statins in colorectal cancer is mediated through the bone morphogenetic protein pathway. *Gastroenterology*, 133 (4):1272-1281.
- Koenig BB, Cook JS, Wolsing DH, Ting J, Tiesman JP, Correa PE, Olson CA, Pecquet AL, Ventura F, Grant RA, et al. 1994. Characterization and cloning of a receptor for BMP-2 and BMP-4 from NIH 3T3 cells. *Mol Cell Biol*, 14 (9):5961-5974.
- Kuliopulos A, Covic L, Seeley SK, Sheridan PJ, Helin J, Costello CE. 1999. Plasmin desensitization of the PAR1 thrombin receptor: kinetics, sites of truncation, and implications for thrombolytic therapy. *Biochemistry*, 38 (14):4572-4585.
- Kusafuka K, Yamaguchi A, Kayano T, Fujiwara M, Takemura T. 1998. Expression of bone morphogenetic proteins in salivary pleomorphic adenomas. *Virchows Arch*, 432 (3):247-253.
- Lai TH, Fong YC, Fu WM, Yang RS, Tang CH. 2008. Osteoblasts-derived BMP-2 enhances the motility of prostate cancer cells via activation of integrins. *Prostate*, 68 (12):1341-1353.
- Langenfeld EM, Bojnowski J, Perone J, Langenfeld J. 2005. Expression of bone morphogenetic proteins in human lung carcinomas. *Ann Thorac Surg*, 80 (3):1028-1032.
- Langenfeld EM, Calvano SE, Abou-Nukta F, Lowry SF, Amenta P, Langenfeld J. 2003. The mature bone morphogenetic protein-2 is aberrantly expressed in non-small cell lung carcinomas and stimulates tumor growth of A549 cells. *Carcinogenesis*, 24 (9):1445-1454.

- Liu F, Ventura F, Doody J, Massague J. 1995. Human type II receptor for bone morphogenic proteins (BMPs): extension of the two-kinase receptor model to the BMPs. *Mol Cell Biol*, 15 (7):3479-3486.
- Liu J, Schuff-Werner P, Steiner M. 2006. Thrombin/thrombin receptor (PAR-1)-mediated induction of IL-8 and VEGF expression in prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 343 (1):183-189.
- Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. 2003. Hepatocellular carcinoma. *Lancet*, 362 (9399):1907-1917.
- Loh K, Chia JA, Greco S, Cozzi SJ, Buttenshaw RL, Bond CE, Simms LA, Pike T, Young JP, Jass JR, Spring KJ, Leggett BA, Whitehall VL. 2008. Bone morphogenic protein 3 inactivation is an early and frequent event in colorectal cancer development. *Genes Chromosomes Cancer*, 47 (6):449-460.
- Longati P, Bardelli A, Ponzetto C, Naldini L, Comoglio PM. 1994. Tyrosines1234-1235 are critical for activation of the tyrosine kinase encoded by the MET proto-oncogene (HGF receptor). *Oncogene*, 9 (1):49-57.
- Macfarlane SR, Seatter MJ, Kanke T, Hunter GD, Plevin R. 2001. Proteinase-activated receptors. *Pharmacol Rev*, 53 (2):245-282.
- Maegdefrau U, Amann T, Winklmeier A, Braig S, Schubert T, Weiss TS, Schardt K, Warnecke C, Hellerbrand C, Bosserhoff AK. 2009. Bone morphogenetic protein 4 is induced in hepatocellular carcinoma by hypoxia and promotes tumour progression. *J Pathol*,
- Maragoudakis ME, Tsopanoglou NE, Andriopoulou P. 2002. Mechanism of thrombin-induced angiogenesis. *Biochem Soc Trans*, 30 (2):173-177.
- Marchio A, Meddeb M, Pineau P, Danglot G, Tiollais P, Bernheim A, Dejean A. 1997. Recurrent chromosomal abnormalities in hepatocellular carcinoma detected by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer*, 18 (1):59-65.
- Massague J. 1998. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem*, 67:753-791.
- Massague J. 2008. TGFbeta in Cancer. *Cell*, 134 (2):215-230.
- Masuda H, Fukabori Y, Nakano K, Takezawa Y, T CS, Yamanaka H. 2003. Increased expression of bone morphogenetic protein-7 in bone metastatic prostate cancer. *Prostate*, 54 (4):268-274.
- Matsuda Y, Yamagiwa S, Takamura M, Honda Y, Ishimoto Y, Ichida T, Aoyagi Y. 2005. Overexpressed Id-1 is associated with a high risk of hepatocellular carcinoma development in patients with cirrhosis without transcriptional repression of p16. *Cancer*, 104 (5):1037-1044.
- McKillop IH, Moran DM, Jin X, Koniaris LG. 2006. Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *J Surg Res*, 136 (1):125-135.

- McRedmond JP, Harriott P, Walker B, Fitzgerald DJ. 2000. Streptokinase-induced platelet activation involves antistreptokinase antibodies and cleavage of protease-activated receptor-1. *Blood*, 95 (4):1301-1308.
- Midorikawa Y, Ishikawa S, Iwanari H, Imamura T, Sakamoto H, Miyazono K, Kodama T, Makuuchi M, Aburatani H. 2003. Glypican-3, overexpressed in hepatocellular carcinoma, modulates FGF2 and BMP-7 signaling. *Int J Cancer*, 103 (4):455-465.
- Miyazono K. 2000. Positive and negative regulation of TGF-beta signaling. *J Cell Sci*, 113 (Pt 7):1101-1109.
- Miyazono K, Maeda S, Imamura T. 2005. BMP receptor signaling: transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk. *Cytokine Growth Factor Rev*, 16 (3):251-263.
- Motoyama K, Tanaka F, Kosaka Y, Mimori K, Uetake H, Inoue H, Sugihara K, Mori M. 2008. Clinical significance of BMP7 in human colorectal cancer. *Ann Surg Oncol*, 15 (5):1530-1537.
- Mulder KM. 2000. Role of Ras and Mapks in TGFbeta signaling. *Cytokine Growth Factor Rev*, 11 (1-2):23-35.
- Muramatsu I, Laniyonu A, Moore GJ, Hollenberg MD. 1992. Vascular actions of thrombin receptor peptide. *Can J Physiol Pharmacol*, 70 (7):996-1003.
- Nakanishi-Matsui M, Zheng YW, Sulciner DJ, Weiss EJ, Ludeman MJ, Coughlin SR. 2000. PAR3 is a cofactor for PAR4 activation by thrombin. *Nature*, 404 (6778):609-613.
- Nakano M, Saito A, Yamamoto M, Doi M, Takasaki K. 1997. Stromal and blood vessel wall invasion in well-differentiated hepatocellular carcinoma. *Liver*, 17 (1):41-46.
- Nanevicz T, Ishii M, Wang L, Chen M, Chen J, Turck CW, Cohen FE, Coughlin SR. 1995. Mechanisms of thrombin receptor agonist specificity. Chimeric receptors and complementary mutations identify an agonist recognition site. *J Biol Chem*, 270 (37):21619-21625.
- Neves SR, Ram PT, Iyengar R. 2002. G protein pathways. *Science*, 296 (5573):1636-1639.
- Nishibori M, Mori S, Takahashi HK. 2005. Physiology and pathophysiology of proteinase-activated receptors (PARs): PAR-2-mediated proliferation of colon cancer cell. *J Pharmacol Sci*, 97 (1):25-30.
- Nohe A, Keating E, Knaus P, Petersen NO. 2004. Signal transduction of bone morphogenetic protein receptors. *Cell Signal*, 16 (3):291-299.
- Nohe A, Keating E, Underhill TM, Knaus P, Petersen NO. 2003. Effect of the distribution and clustering of the type I A BMP receptor (ALK3) with the type II BMP receptor on the activation of signalling pathways. *J Cell Sci*, 116 (Pt 16):3277-3284.

- Nystedt S, Emilsson K, Wahlestedt C, Sundelin J. 1994. Molecular cloning of a potential proteinase activated receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91 (20):9208-9212.
- Ogata T, Wozney JM, Benezra R, Noda M. 1993. Bone morphogenetic protein 2 transiently enhances expression of a gene, Id (inhibitor of differentiation), encoding a helix-loop-helix molecule in osteoblast-like cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90 (19):9219-9222.
- Okamoto T, Nishibori M, Sawada K, Iwagaki H, Nakaya N, Jikuhara A, Tanaka N, Saeki K. 2001. The effects of stimulating protease-activated receptor-1 and -2 in A172 human glioblastoma. *J Neural Transm*, 108 (2):125-140.
- Okuda K. 2000. Hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*, 32 (1 Suppl):225-237.
- Onichtchouk D, Chen YG, Dosch R, Gawantka V, Delius H, Massague J, Niehrs C. 1999. Silencing of TGF-beta signalling by the pseudoreceptor BAMBI. *Nature*, 401 (6752):480-485.
- Ossovskaia VS, Bunnett NW. 2004. Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease. *Physiol Rev*, 84 (2):579-621.
- Pang R, Tse E, Poon RT. 2006. Molecular pathways in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett*, 240 (2):157-169.
- Park M, Dean M, Kaul K, Braun MJ, Gonda MA, Vande Woude G. 1987. Sequence of MET protooncogene cDNA has features characteristic of the tyrosine kinase family of growth-factor receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84 (18):6379-6383.
- Park M, Dean M, Cooper CS, Schmidt M, O'Brien SJ, Blair DG, Vande Woude GF. 1986. Mechanism of met oncogene activation. *Cell*, 45 (6):895-904.
- Park SH. 2005. Fine tuning and cross-talking of TGF-beta signal by inhibitory Smads. *J Biochem Mol Biol*, 38 (1):9-16.
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. 2001. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int J Cancer*, 94 (2):153-156.
- Peruzzi B, Bottaro DP. 2006. Targeting the c-Met signaling pathway in cancer. *Clin Cancer Res*, 12 (12):3657-3660.
- Piccirillo SG, Vescovi AL. 2006. Bone morphogenetic proteins regulate tumorigenicity in human glioblastoma stem cells. *Ernst Schering Found Symp Proc*, (5):59-81.
- Piccirillo SG, Reynolds BA, Zanetti N, Lamorte G, Binda E, Broggi G, Brem H, Olivi A, Dimeco F, Vescovi AL. 2006. Bone morphogenetic proteins inhibit the tumorigenic potential of human brain tumour-initiating cells. *Nature*, 444 (7120):761-765.
- Qian Y, Corum L, Meng Q, Blenis J, Zheng JZ, Shi X, Flynn DC, Jiang BH. 2004. PI3K induced actin filament remodeling through Akt and p70S6K1: implication of essential role in cell migration. *Am J Physiol Cell Physiol*, 286 (1):C153-163.

- Raftopoulou M, Hall A. 2004. Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev Biol*, 265 (1):23-32.
- Raida M, Heymann AC, Gunther C, Niederwieser D. 2006. Role of bone morphogenetic protein 2 in the crosstalk between endothelial progenitor cells and mesenchymal stem cells. *Int J Mol Med*, 18 (4):735-739.
- Raida M, Sarbia M, Clement JH, Adam S, Gabbert HE, Hoffken K. 1999. Expression, regulation and clinical significance of bone morphogenetic protein 6 in esophageal squamous-cell carcinoma. *Int J Cancer*, 83 (1):38-44.
- Ramachandran R, Hollenberg MD. 2008. Proteinases and signalling: pathophysiological and therapeutic implications via PARs and more. *Br J Pharmacol*, 153 Suppl 1:S263-282.
- Rasmussen UB, Vouret-Craviari V, Jallat S, Schlesinger Y, Pages G, Pavirani A, Lecocq JP, Pouyssegur J, Van Obberghen-Schilling E. 1991. cDNA cloning and expression of a hamster alpha-thrombin receptor coupled to Ca²⁺ mobilization. *FEBS Lett*, 288 (1-2):123-128.
- Ridley AJ, Hall A. 1992. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell*, 70 (3):389-399.
- Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, Parsons JT, Horwitz AR. 2003. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science*, 302 (5651):1704-1709.
- Riewald M, Ruf W. 2001. Mechanistic coupling of protease signaling and initiation of coagulation by tissue factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98 (14):7742-7747.
- Riewald M, Petrovan RJ, Donner A, Mueller BM, Ruf W. 2002. Activation of endothelial cell protease activated receptor 1 by the protein C pathway. *Science*, 296 (5574):1880-1882.
- Rosario M, Birchmeier W. 2003. How to make tubes: signaling by the Met receptor tyrosine kinase. *Trends Cell Biol*, 13 (6):328-335.
- Rossi JM, Dunn NR, Hogan BL, Zaret KS. 2001. Distinct mesodermal signals, including BMPs from the septum transversum mesenchyme, are required in combination for hepatogenesis from the endoderm. *Genes Dev*, 15 (15):1998-2009.
- Rothhammer T, Poser I, Soncin F, Bataille F, Moser M, Bosserhoff AK. 2005. Bone morphogenic proteins are overexpressed in malignant melanoma and promote cell invasion and migration. *Cancer Res*, 65 (2):448-456.
- Rudroff C, Schafberg H, Nowak G, Weinell R, Scheele J, Kaufmann R. 1998. Characterization of functional thrombin receptors in human pancreatic tumor cells (MIA PACA-2). *Pancreas*, 16 (2):189-194.

- Sabri A, Short J, Guo J, Steinberg SF. 2002. Protease-activated receptor-1-mediated DNA synthesis in cardiac fibroblast is via epidermal growth factor receptor transactivation: distinct PAR-1 signaling pathways in cardiac fibroblasts and cardiomyocytes. *Circ Res*, 91 (6):532-539.
- Sabri A, Guo J, Elouardighi H, Darrow AL, Andrade-Gordon P, Steinberg SF. 2003. Mechanisms of protease-activated receptor-4 actions in cardiomyocytes. Role of Src tyrosine kinase. *J Biol Chem*, 278 (13):11714-11720.
- Sambrano GR, Weiss EJ, Zheng YW, Huang W, Coughlin SR. 2001. Role of thrombin signalling in platelets in haemostasis and thrombosis. *Nature*, 413 (6851):74-78.
- Schofer M, Fuchs-Winkelmann S, Wack C, Rudisile M, Dersch R, Leifeld I, Wendorff J, Greiner A, Paletta JR, Boudriot U. 2009. Lack of obvious influence of PLLA nanofibers on the gene expression of BMP-2 and VEGF during growth and differentiation of human mesenchymal stem cells. *ScientificWorldJournal*, 9:313-319.
- Seasholtz TM, Majumdar M, Kaplan DD, Brown JH. 1999. Rho and Rho kinase mediate thrombin-stimulated vascular smooth muscle cell DNA synthesis and migration. *Circ Res*, 84 (10):1186-1193.
- Shepherd TG, Theriault BL, Nachtigal MW. 2008. Autocrine BMP4 signalling regulates ID3 proto-oncogene expression in human ovarian cancer cells. *Gene*, 414 (1-2):95-105.
- Shi X, Gangadharan B, Brass LF, Ruf W, Mueller BM. 2004. Protease-activated receptors (PAR1 and PAR2) contribute to tumor cell motility and metastasis. *Mol Cancer Res*, 2 (7):395-402.
- Shi Y, Massague J. 2003. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*, 113 (6):685-700.
- Shimamoto R, Sawada T, Uchima Y, Inoue M, Kimura K, Yamashita Y, Yamada N, Nishihara T, Ohira M, Hirakawa K. 2004. A role for protease-activated receptor-2 in pancreatic cancer cell proliferation. *Int J Oncol*, 24 (6):1401-1406.
- Shimasaki S, Moore RK, Otsuka F, Erickson GF. 2004. The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. *Endocr Rev*, 25 (1):72-101.
- Smedile A, Bugianesi E. 2005. Steatosis and hepatocellular carcinoma risk. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 9 (5):291-293.
- Smela ME, Currier SS, Bailey EA, Essigmann JM. 2001. The chemistry and biology of aflatoxin B(1): from mutational spectrometry to carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 22 (4):535-545.
- Sneddon JB, Zhen HH, Montgomery K, van de Rijn M, Tward AD, West R, Gladstone H, Chang HY, Morganroth GS, Oro AE, Brown PO. 2006. Bone morphogenetic protein antagonist gremlin 1 is widely expressed by cancer-associated stromal cells and can promote tumor cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103 (40):14842-14847.

- Song JJ, Celeste AJ, Kong FM, Jirtle RL, Rosen V, Thies RS. 1995. Bone morphogenetic protein-9 binds to liver cells and stimulates proliferation. *Endocrinology*, 136 (10):4293-4297.
- Steinhoff M, Buddenkotte J, Shpacovitch V, Rattenholl A, Moormann C, Vergnolle N, Luger TA, Hollenberg MD. 2005. Proteinase-activated receptors: transducers of proteinase-mediated signaling in inflammation and immune response. *Endocr Rev*, 26 (1):1-43.
- Sugimura T. 1992. Multistep carcinogenesis: a 1992 perspective. *Science*, 258 (5082):603-607.
- Takayama T, Makuuchi M, Hirohashi S, Sakamoto M, Okazaki N, Takayasu K, Kosuge T, Motoo Y, Yamazaki S, Hasegawa H. 1990. Malignant transformation of adenomatous hyperplasia to hepatocellular carcinoma. *Lancet*, 336 (8724):1150-1153.
- Tanaka S, Arii S. 2009. Molecularly targeted therapy for hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci*, 100 (1):1-8.
- Tellez C, McCarty M, Ruiz M, Bar-Eli M. 2003. Loss of activator protein-2alpha results in overexpression of protease-activated receptor-1 and correlates with the malignant phenotype of human melanoma. *J Biol Chem*, 278 (47):46632-46642.
- ten Dijke P, Miyazono K, Heldin CH. 1996. Signaling via hetero-oligomeric complexes of type I and type II serine/threonine kinase receptors. *Curr Opin Cell Biol*, 8 (2):139-145.
- ten Dijke P, Goumans MJ, Itoh F, Itoh S. 2002. Regulation of cell proliferation by Smad proteins. *J Cell Physiol*, 191 (1):1-16.
- ten Dijke P, Yamashita H, Sampath TK, Reddi AH, Estevez M, Riddle DL, Ichijo H, Heldin CH, Miyazono K. 1994. Identification of type I receptors for osteogenic protein-1 and bone morphogenetic protein-4. *J Biol Chem*, 269 (25):16985-16988.
- Theriault BL, Shepherd TG, Mujoomdar ML, Nachtigal MW. 2007. BMP4 induces EMT and Rho GTPase activation in human ovarian cancer cells. *Carcinogenesis*, 28 (6):1153-1162.
- Thiery JP. 2003. Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies. *Curr Opin Cell Biol*, 15 (6):740-746.
- Trusolino L, Comoglio PM. 2002. Scatter-factor and semaphorin receptors: cell signalling for invasive growth. *Nat Rev Cancer*, 2 (4):289-300.
- Tsopanoglou NE, Maragoudakis ME. 2004. Role of thrombin in angiogenesis and tumor progression. *Semin Thromb Hemost*, 30 (1):63-69.
- Tsopanoglou NE, Maragoudakis ME. 2007. Inhibition of angiogenesis by small-molecule antagonists of protease-activated receptor-1. *Semin Thromb Hemost*, 33 (7):680-687.
- Urist MR. 1965. Bone: formation by autoinduction. *Science*, 150 (698):893-899.

- Vergnolle N, Wallace JL, Bunnett NW, Hollenberg MD. 2001. Protease-activated receptors in inflammation, neuronal signaling and pain. *Trends Pharmacol Sci*, 22 (3):146-152.
- von Bubnoff A, Cho KW. 2001. Intracellular BMP signaling regulation in vertebrates: pathway or network? *Dev Biol*, 239 (1):1-14.
- Vu TK, Hung DT, Wheaton VI, Coughlin SR. 1991a. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell*, 64 (6):1057-1068.
- Vu TK, Wheaton VI, Hung DT, Charo I, Coughlin SR. 1991b. Domains specifying thrombin-receptor interaction. *Nature*, 353 (6345):674-677.
- Wang H, Uhl JJ, Stricker R, Reiser G. 2002. Thrombin (PAR-1)-induced proliferation in astrocytes via MAPK involves multiple signaling pathways. *Am J Physiol Cell Physiol*, 283 (5):C1351-1364.
- Weinberg RA. 1989. Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogenesis. *Cancer Res*, 49 (14):3713-3721.
- Wettschureck N, Offermanns S. 2002. Rho/Rho-kinase mediated signaling in physiology and pathophysiology. *J Mol Med*, 80 (10):629-638.
- Wilhelm S, Chien DS. 2002. BAY 43-9006: preclinical data. *Curr Pharm Des*, 8 (25):2255-2257.
- Wojtukiewicz MZ, Tang DG, Ben-Josef E, Renaud C, Walz DA, Honn KV. 1995. Solid tumor cells express functional "tethered ligand" thrombin receptor. *Cancer Res*, 55 (3):698-704.
- Wong CM, Ng IO. 2008. Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *Liver Int*, 28 (2):160-174.
- Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM, Wang EA. 1988. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science*, 242 (4885):1528-1534.
- Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massague J. 1994. Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature*, 370 (6488):341-347.
- Xu CP, Ji WM, van den Brink GR, Peppelenbosch MP. 2006. Bone morphogenetic protein-2 is a negative regulator of hepatocyte proliferation downregulated in the regenerating liver. *World J Gastroenterol*, 12 (47):7621-7625.
- Xu WF, Andersen H, Whitmore TE, Presnell SR, Yee DP, Ching A, Gilbert T, Davie EW, Foster DC. 1998. Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95 (12):6642-6646.
- Yada K, Shibata K, Matsumoto T, Ohta M, Yokoyama S, Kitano S. 2005. Protease-activated receptor-2 regulates cell proliferation and enhances cyclooxygenase-2 mRNA expression in human pancreatic cancer cells. *J Surg Oncol*, 89 (2):79-85.

- Yakicier MC, Irmak MB, Romano A, Kew M, Ozturk M. 1999. Smad2 and Smad4 gene mutations in hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, 18 (34):4879-4883.
- Yang S, Zhong C, Frenkel B, Reddi AH, Roy-Burman P. 2005. Diverse biological effect and Smad signaling of bone morphogenetic protein 7 in prostate tumor cells. *Cancer Res*, 65 (13):5769-5777.
- Yates PR, Atherton GT, Deed RW, Norton JD, Sharrocks AD. 1999. Id helix-loop-helix proteins inhibit nucleoprotein complex formation by the TCF ETS-domain transcription factors. *EMBO J*, 18 (4):968-976.
- Ye L, Lewis-Russell JM, Kyanaston HG, Jiang WG. 2007. Bone morphogenetic proteins and their receptor signaling in prostate cancer. *Histol Histopathol*, 22 (10):1129-1147.
- Yoshida Y, von Bubnoff A, Ikematsu N, Blitz IL, Tsuzuku JK, Yoshida EH, Umemori H, Miyazono K, Yamamoto T, Cho KW. 2003. Tob proteins enhance inhibitory Smad-receptor interactions to repress BMP signaling. *Mech Dev*, 120 (5):629-637.
- You WK, McDonald DM. 2008. The hepatocyte growth factor/c-Met signaling pathway as a therapeutic target to inhibit angiogenesis. *BMB Rep*, 41 (12):833-839.
- Yu PB, Hong CC, Sachidanandan C, Babitt JL, Deng DY, Hoyng SA, Lin HY, Bloch KD, Peterson RT. 2008. Dorsomorphin inhibits BMP signals required for embryogenesis and iron metabolism. *Nat Chem Biol*, 4 (1):33-41.
- Zhang YW, Vande Woude GF. 2003. HGF/SF-met signaling in the control of branching morphogenesis and invasion. *J Cell Biochem*, 88 (2):408-417.
- Zhu H, Kavsak P, Abdollah S, Wrana JL, Thomsen GH. 1999. A SMAD ubiquitin ligase targets the BMP pathway and affects embryonic pattern formation. *Nature*, 400 (6745):687-693.
- Zoudilova M, Kumar P, Ge L, Wang P, Bokoch GM, DeFea KA. 2007. Beta-arrestin-dependent regulation of the cofilin pathway downstream of protease-activated receptor-2. *J Biol Chem*, 282 (28):20634-20646.

Anhang

A Firmenvertretungen

GE Healthcare
Analytik Jena
B. Braun Melsungen AG
Beckman Coulter
Biochrom AG
Biometra®
Bio-Rad
Carl Roth®
Cell Signaling Technology®
Eppendorf
Forma Scientific
Fresenius Kabi Deutschland
Fujifilm
GFL®
Greiner-Bio-One
Haemochrom Diagnostica Supplies
Heraeus Instruments
ICN
IKA® Labortechnik
Intas
Invitrogen™
Jena Scientific
J. T. Baker
Memmert
Menzel
Mettler
Nerbe Plus
Neuro Probe
New England Biolabs
Pechiney Plastic Packaging
Peq Lab
Pharmacia
QIAGEN
Roche-Diagnostics
Santa Cruz Biotechnology
Sarstedt
Sigma
Techno Plastic Products AG
Whatman Inc.
Zeiss

Buckinghamshire, GB
Jena
Melsungen
Krefeld
Berlin
Göttingen
München
Karlsruhe
Frankfurt
Hamburg
Waltham, MA, USA
Bad Homburg v.d.H.
Düsseldorf
Leipzig
Frickenhausen
Essen
Hanau
Eschwege
Staufen
Göttingen
Eggenstein
Jena
Griesheim
Schwabach
Braunschweig
Heidelberg
Winsen/Luhe
Gaithersburg, MD, USA
Frankfurt
Pliening
Erlangen
Uppsala, Schweden
Hilden
Mannheim
Heidelberg
Nümbrecht
Steinheim
Trasadingen, CH
Dassel
Jena

B Chemikalien

10x PCR-Puffer	[QIAGEN]
1kb DNA-Ladder	[Invitrogen™]
5x Reaktionspuffer	[Invitrogen™]
Agarose (Elektrophoresis Grade)	[Invitrogen™]
Ampuwa® (Wasser für Injektionszwecke)	[Fresenius Kabi Dtschl.]
Aprotinin	[Roche-Diagnostics]
Bradford Reagent	[Sigma]
Bromphenolblau	[Sigma]
BSA	[Sigma]
Coulter® Isoton® II Diluent	[Beckman Coulter]
Cruz Marker™	[Santa Cruz Biotechnology]
DMSO	[Sigma]
dNTP-Mix (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) (2,5 mM each)	[New England Biolabs]
Dorsomorphin	[Sigma]
D-PBS	[Invitrogen]
DTT (0,1 M)	[Invitrogen™]
ECL™ Western Blotting Detection Reagents	[Amersham™]
EDTA	[Sigma]
EGTA	[Sigma]
Essigsäure (0,2 %)	[Carl Roth®]
Ethanol (96 %)	[J. T. Baker]
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	[Invitrogen™]
FCS	[Biochrom AG]
Giemsafarbe als Pulver	[Sigma]
Glycerin	[Sigma]
Glycin	[Carl Roth®]
HEPES	[Sigma]
Isoton® II Diluent Beckman Coulter	[Beckman Coulter]
Kollagen	[Roche-Diagnostics]
Leupeptin	[Roche Diagnostics]
Methanol	[Carl Roth®]
M-MLV Reverse Transkriptase (200 U/μl)	[Invitrogen™]
Na ₂ -EDTA	[Sigma]
Na ₃ VO ₄	[Sigma]
Na ₄ P ₂ O ₇	[Sigma]
NaCl	[Caro Roth®]
NaF	[ICN]
Oligo-(dT) ₁₅ -Primer (0,2 mg/ml)	[Roche-Diagnostics]
PefaBloc	[Roche-Diagnostics]
Pepstatin	[Roche-Diagnostics]
Precision Plus Protein™ Kaleidoscope Standards	[Bio-Rad]
Random Primers (0,2 mg/ml)	[Invitrogen™]
RNaseOUT™	[Invitrogen™]
SDS	[Sigma]
SYBR-Green	[Roche-Diagnostics]
Taq-DNA-Polymerase (5 U/μl)	[QIAGEN]
Thrombin (1 U/ml)	[Neuro Probe]
Tris base	[Sigma]
Tris-HCl	[Carl Roth®]

Triton-X-100	[Sigma]
Trypsin-EDTA	[Invitrogen™]
Tween® 20	[Sigma]
XT MES Running Buffer, 20X	[Bio-Rad]
XT Reducing Agent, 20X	[Bio-Rad]
XT Sample Buffer, 4X	[Bio-Rad]
β-Mercaptoethanol	[Sigma]

C Laborgeräte

48-Well Micro Chemotaxis Chamber	[Neuro Probe]
Agagel Maxi/Mini Gelelektrophoresekammer	[Biometra®]
Centrifuge 5415C	[Eppendorf]
Centrifuge 5415D	[Eppendorf]
Centrifuge 5417C	[Eppendorf]
Centrifuge 5810R	[Eppendorf]
Coulter® Z2 particle count & size analyzer	[Beckman Coulter]
Elektrophoresekammer Criterion™	[Bio-Rad]
Foliensiegler	[Eppendorf]
Gel Jet Imager	[Intas]
Kühlblock	[Eppendorf]
LightCycler®	[Roche-Diagnostics]
Mastercycler® ep realplex	[Eppendorf]
Megafuge 2.0 R	[Heraeus Instruments]
Mikroskop Axiolab	[Zeiss]
Mikroskop Axiovert 25	[Zeiss]
Mikrowelle	[Daewoo]
MS2 Minishaker	[IKA® Labortechnik]
Pharmacia LKB Ultrospec III Photometer	[Pharmacia]
Schüttler HS 501 digital	[IKA® Labortechnik]
STERI-CULT 200 Incubator	[Forma Scientific]
Sterilwerkbank HERAsafe® HS 12/2	[Heraeus Instruments]
Stickstoffbehälter Chronos	[Messer-Griesheim]
Stromquelle LKB 2103 Power Supply	[LKB Biochrom]
Stromquelle MightySlim™ SX 250 Power Supply	[Hofer®]
Stromquelle Power Pac 200	[Bio-Rad]
Stromquelle Power Pac HC™	[Bio-Rad]
Stromquelle PS 500XT DC Power Supply	[Hofer®]
Thermomixer 5436	[Eppendorf]
Thermomixer comfort	[Eppendorf]
Thermoschrank TS 20/27	[Heraeus Instrumnts]
Trans-Blot® SD Semi –Dry Transwell Cell	[Bio-Rad]
TRIO-Thermoblock™	[Biometra®]
UV/VIS-Spektralphotometer (Nano Drop ND-1000)	[PeqLab]
Vortexer VF2	[IKA® Labortechnik]
Waage PE 2000	[Mettler]
Wasserbad	[GFL®]
Wasserbad	[Memmert]
LAS-3000 (Luminescent Image Analysis System)	[Fujifilm]

D Verbrauchsmaterialien

Adhäsive Verschlussfolien für PCR	[Nerbe Plus]
CapStrips	[Eppendorf]
Criterion™ XT Precast Gel (10% Bis-Tris)	[Bio-Rad]
Einweg-Pipetten (5ml, 10 ml, 25 ml)	[Greiner-Bio-One]
Extra Thick Blot Paper Criterion™ Size	[Bio-Rad]
Falkonröhrchen (15 ml, 50 ml)	[Greiner-Bio-One]
Filterpapier für Giemsa-Lösung	[Whatman Inc.]
Heat Sealing Film	[Eppendorf]
Immun-Blot™ PVDF Membran	[Bio-Rad]
Kryoröhrchen	[Greiner-Bio-One]
LightCycler® Capillaries	[Roche-Diagnostics]
Mikrotiterplatten (96-well) für PCR	[Eppendorf]
Objektträger	[Menzel]
Parafilm	[Pechiney Plastic Packaging]
Petrischalen	[Greiner-Bio-One]
Pipettenspitzen	[Greiner-Bio-One]
Pipettenspitzen mit Filter	[Nerbe Plus]
Plastikküvetten	[Sarstedt]
Polycarbonatmembran (8 µm Poren, 25 x 80 mm)	[Neuro Probe]
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml)	[Eppendorf]
Softasept® N	[B. Braun Melsungen AG]
Spezial-Vernichtungsbeutel CPP	[Nerbe Plus]
Zellkulturflaschen Cellstar® (25 cm ² , 75 cm ²)	[Greiner-Bio-One]
Zellschaber TPP	[Techno Plastic Products AG]

E Expressionsänderung von Genen bei der Zelllinie HepG2 nach Inkubation mit PAR-Agonisten

E1 Expressionslevel von BMPs

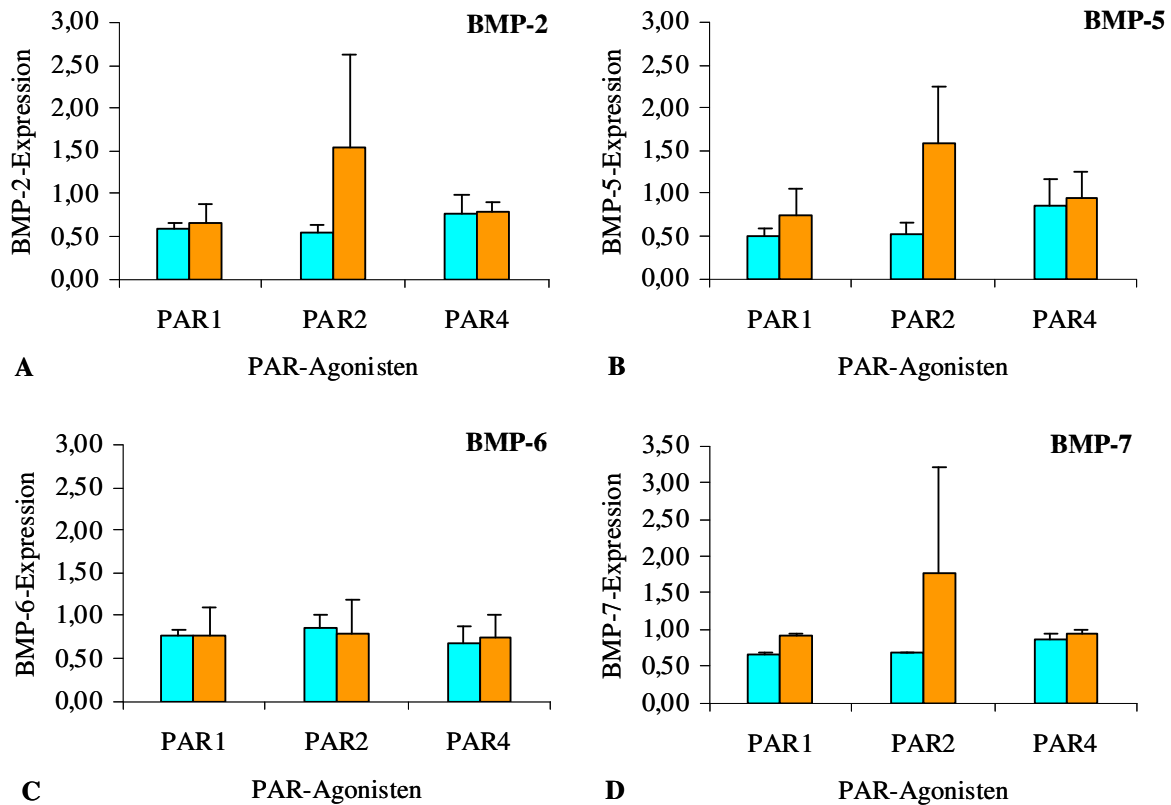


Abb. E1 Expressionslevel von BMP-2, BMP-5, BMP-6 und BMP-7 bei der Zelllinie HepG2 im Inkubationsversuch mit PAR-Agonisten PAR₁, PAR₂ und PAR₄.

Die Zellen wurden für 4h und 24h mit jeweils 100 μ M des PAR₁-Agonisten, 10 μ M des PAR₂-Agonisten und 400 μ M des PAR₄-Agonisten inkubiert. Aus den Zellen wurde die Gesamt-RNA isoliert und die cDNA synthetisiert. Die Genexpression der BMPs wurde anschließend mittels realtime-PCR quantifiziert. Als interne Kontrolle diente das Housekeeping-Gen β -Aktin. Der Versuch wurde zweifach durchgeführt (n=2). Die erhaltenen Transkriptmengen wurden auf β -Aktin abgeglichen und auf die Kontrolle (serumfreies Medium) bezogen. Die so erhaltenen Expressionslevel wurden anschließend gemittelt und grafisch dargestellt. Die Kontrolle nimmt hierbei den Wert 1 an. Hierbei erscheinen die 4h-Werte als hellblaue und die 24h-Werte als orange Balken. Abb. A stellt das Expressionslevel von BMP-2 dar, Abb. B zeigt das Expressionslevel von BMP-5, Abb. C zeigt das Expressionslevel von BMP-6 und Abb. D stellt das Expressionslevel von BMP-7 dar.

E2 Expressionslevel von BMP-Rezeptoren

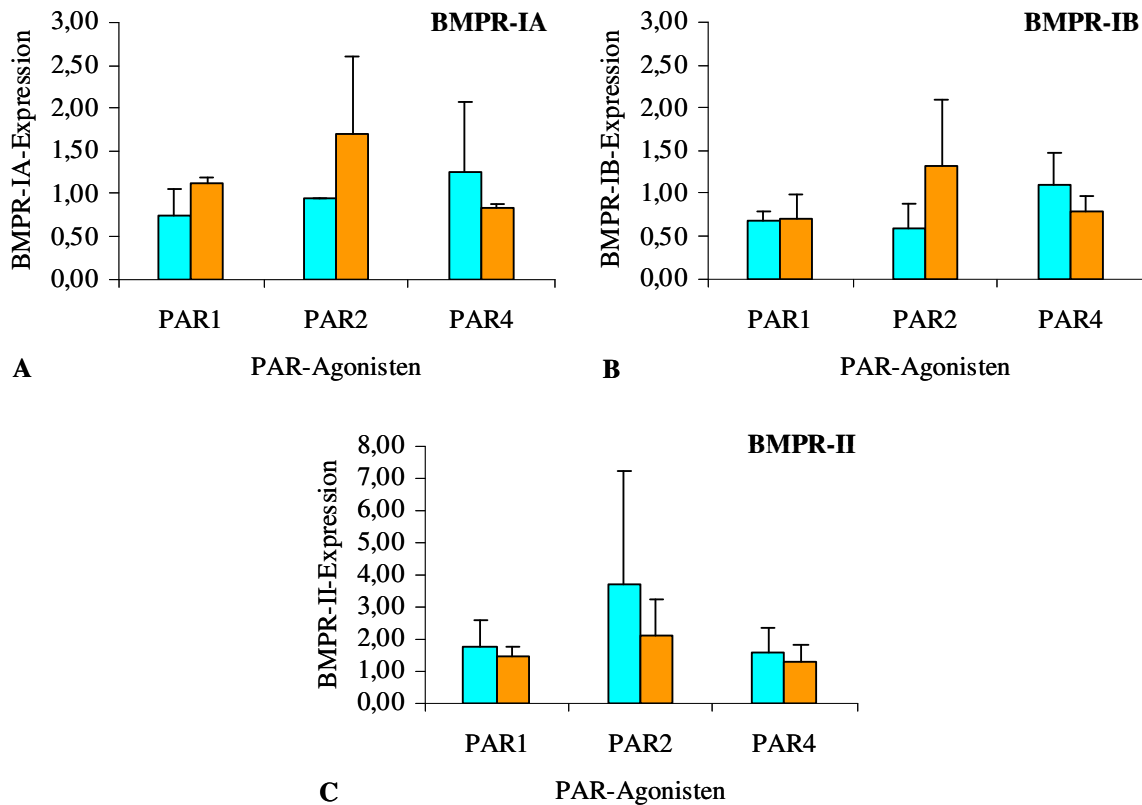


Abb. E2 Expressionslevel der BMP-Rezeptoren BMPR-IA, BMPR-IB und BMPR-II bei der Zelllinie HepG2 im Inkubationsversuch mit PAR-Agonisten PAR₁, PAR₂ und PAR₄.

Die Zellen wurden für 4h und 24h mit jeweils 100 μ M des PAR₁-Agonisten, 10 μ M des PAR₂-Agonisten und 400 μ M des PAR₄-Agonisten inkubiert. Aus den Zellen wurde die Gesamt-RNA isoliert und die cDNA synthetisiert. Die Genexpression der BMP-Rezeptoren wurde anschließend mittels realtime-PCR quantifiziert. Als interne Kontrolle diente das Housekeeping-Gen β -Aktin. Der Versuch wurde zweifach durchgeführt (n=2). Die erhaltenen Transkriptmengen wurden auf β -Aktin abgeglichen und auf die Kontrolle (serumfreies Medium) bezogen. Die so erhaltenen Expressionslevel wurden anschließend gemittelt und grafisch dargestellt. Die Kontrolle nimmt hierbei den Wert 1 an. Hierbei erscheinen die 4h-Werte als hellblaue und die 24h-Werte als orange Balken. Abb. **A** stellt das Expressionslevel vom BMPR-IA dar, Abb. **B** zeigt das Expressionslevel vom BMPR-IB und Abb. **C** zeigt das Expressionslevel vom BMPR-II.

E3 Expressionslevel von Aktivinrezeptoren

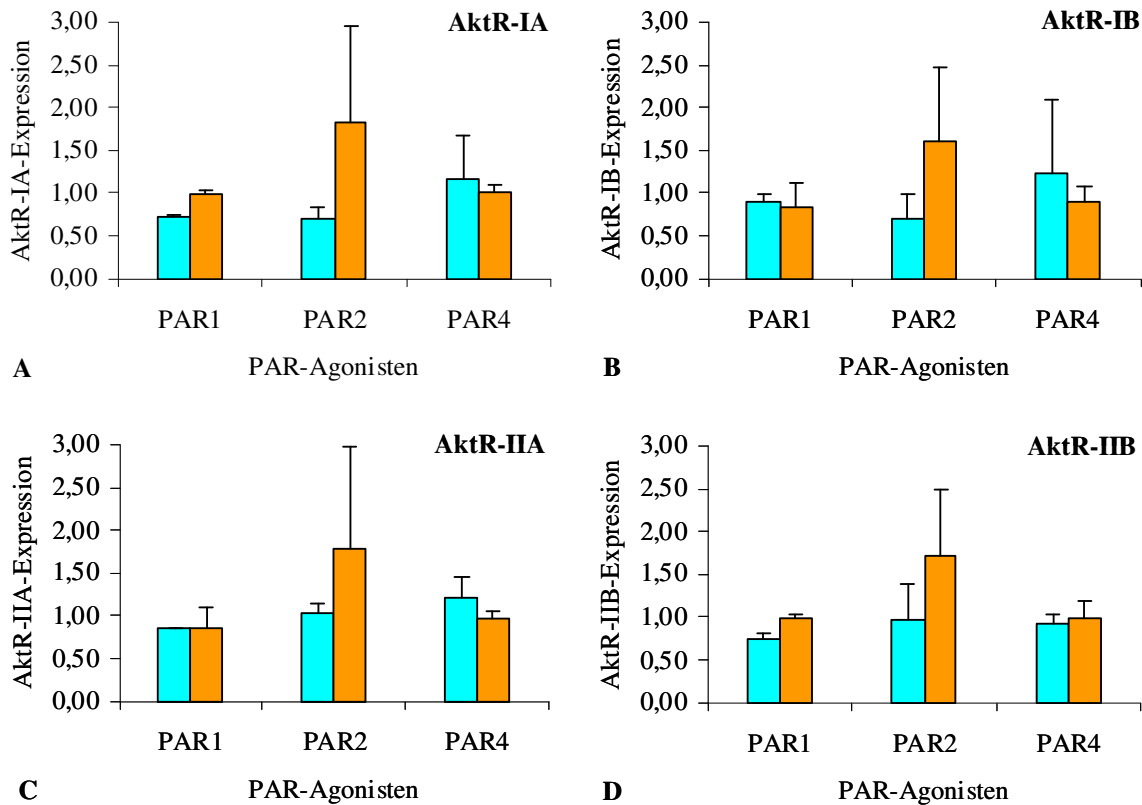


Abb. E3 Expressionslevel der Aktivinrezeptoren AktR-IA, AktR-IB, AktR-IIA und AktR-IIB bei der Zelllinie HepG2 im Inkubationsversuch mit PAR-Agonisten PAR₁, PAR₂ und PAR₄.

Die Zellen wurden für 4h und 24h mit jeweils 100 μ M des PAR₁-Agonisten, 10 μ M des PAR₂-Agonisten und 400 μ M des PAR₄-Agonisten inkubiert. Aus den Zellen wurde die Gesamt-RNA isoliert und die cDNA synthetisiert. Die Genexpression der Aktivinrezeptoren wurde anschließend mittels realtime-PCR quantifiziert. Als interne Kontrolle diente das Housekeeping-Gen β -Aktin. Der Versuch wurde zweifach durchgeführt (n=2). Die erhaltenen Transkriptmengen wurden auf β -Aktin abgeglichen und auf die Kontrolle (serumfreies Medium) bezogen. Die so erhaltenen Expressionslevel wurden anschließend gemittelt und grafisch dargestellt. Die Kontrolle nimmt hierbei den Wert 1 an. Hierbei erscheinen die 4h-Werte als hellblaue und die 24h-Werte als orange Balken. Abb. **A** stellt das Expressionslevel vom AktR-IA dar, Abb. **B** zeigt das Expressionslevel vom AktR-IB, Abb. **C** zeigt das Expressionslevel vom AktR-IIA und Abb. **D** stellt das Expressionslevel vom AktR-IIB dar.

E4 Expressionslevel von BMP-Inhibitoren

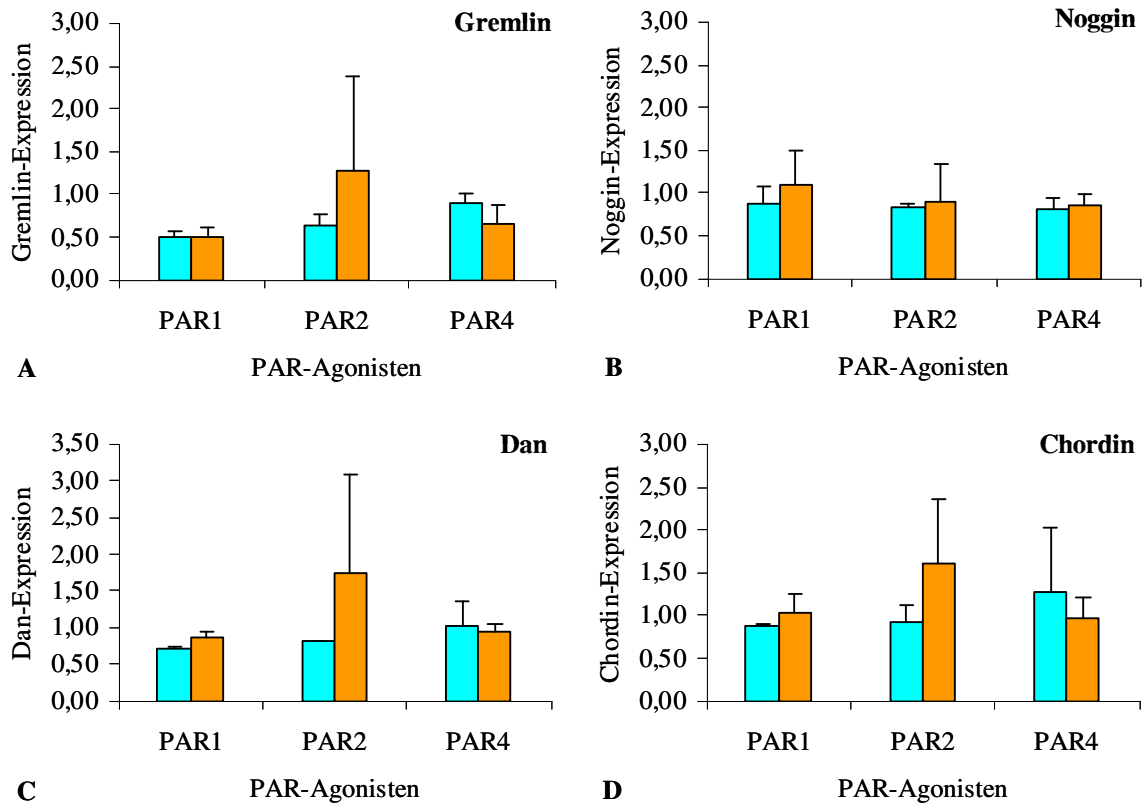


Abb. E4 Expressionslevel der BMP-Inhibitoren Gremlin, Noggin, Dan und Chordin bei der Zelllinie HepG2 im Inkubationsversuch mit PAR-Agonisten PAR₁, PAR₂ und PAR₄.

Die Zellen wurden für 4h und 24h mit jeweils 100 μ M des PAR₁-Agonisten, 10 μ M des PAR₂-Agonisten und 400 μ M des PAR₄-Agonisten inkubiert. Aus den Zellen wurde die Gesamt-RNA isoliert und die cDNA synthetisiert. Die Genexpression der BMP-Inhibitoren wurde anschließend mittels realtime-PCR quantifiziert. Als interne Kontrolle diente das Housekeeping-Gen β -Aktin. Der Versuch wurde zweifach durchgeführt (n=2). Die erhaltenen Transkriptmengen wurden auf β -Aktin abgeglichen und auf die Kontrolle (serumfreies Medium) bezogen. Die so erhaltenen Expressionslevel wurden anschließend gemittelt und grafisch dargestellt. Die Kontrolle nimmt hierbei den Wert 1 an. Hierbei erscheinen die 4h-Werte als hellblaue und die 24h-Werte als orange Balken. Abb. **A** stellt das Expressionslevel von Gremlin dar, Abb. **B** zeigt das Expressionslevel von Noggin, Abb. **C** zeigt das Expressionslevel von Dan und Abb. **D** stellt das Expressionslevel von Chordin dar.

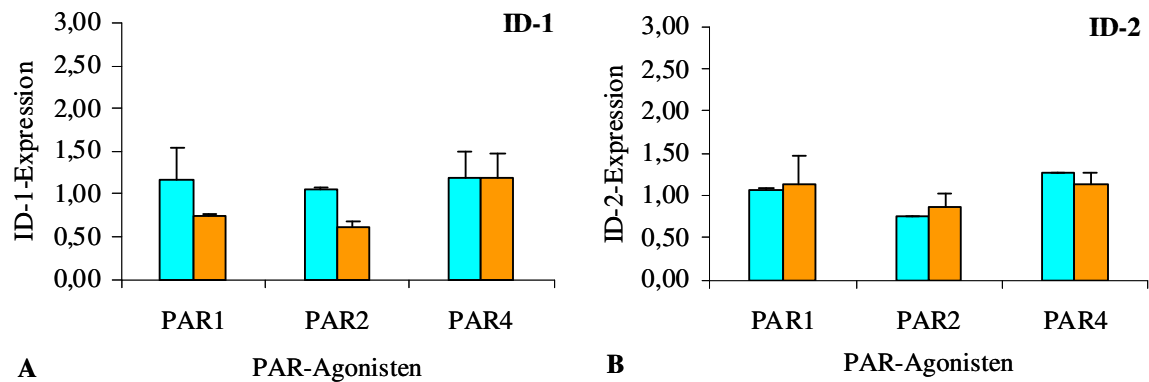
E5 Expressionslevel von BMP-Zielgenen

Abb. E5 Expressionslevel der BMP-Zielgene ID-1 und ID-2 bei der Zelllinie HepG2 im Inkubationsversuch mit PAR-Agonisten PAR₁, PAR₂ und PAR₄.

Die Zellen wurden für 4h und 24h mit jeweils 100 μ M des PAR₁-Agonisten, 10 μ M des PAR₂-Agonisten und 400 μ M des PAR₄-Agonisten inkubiert. Aus den Zellen wurde die Gesamt-RNA isoliert und die cDNA synthetisiert. Die Genexpression von ID-1 und ID-2 wurde anschließend mittels realtime-PCR quantifiziert. Als interne Kontrolle diente das Housekeeping-Gen β -Aktin. Der Versuch wurde zweifach durchgeführt (n=2). Die erhaltenen Transkriptmengen wurden auf β -Aktin abgeglichen und auf die Kontrolle (serumfreies Medium) bezogen. Die so erhaltenen Expressionslevel wurden anschließend gemittelt und grafisch dargestellt. Die Kontrolle nimmt hierbei den Wert 1 an. Hierbei erscheinen die 4h-Werte als hellblaue und die 24h-Werte als orange Balken. Abb. **A** stellt das Expressionslevel von ID-1 dar, Abb. **B** zeigt das Expressionslevel von ID-2.

F Expressionsänderung von Genen bei der Zelllinie Sk-Hep1 nach Inkubation mit PAR-Agonisten

F1 Expressionslevel von BMPs

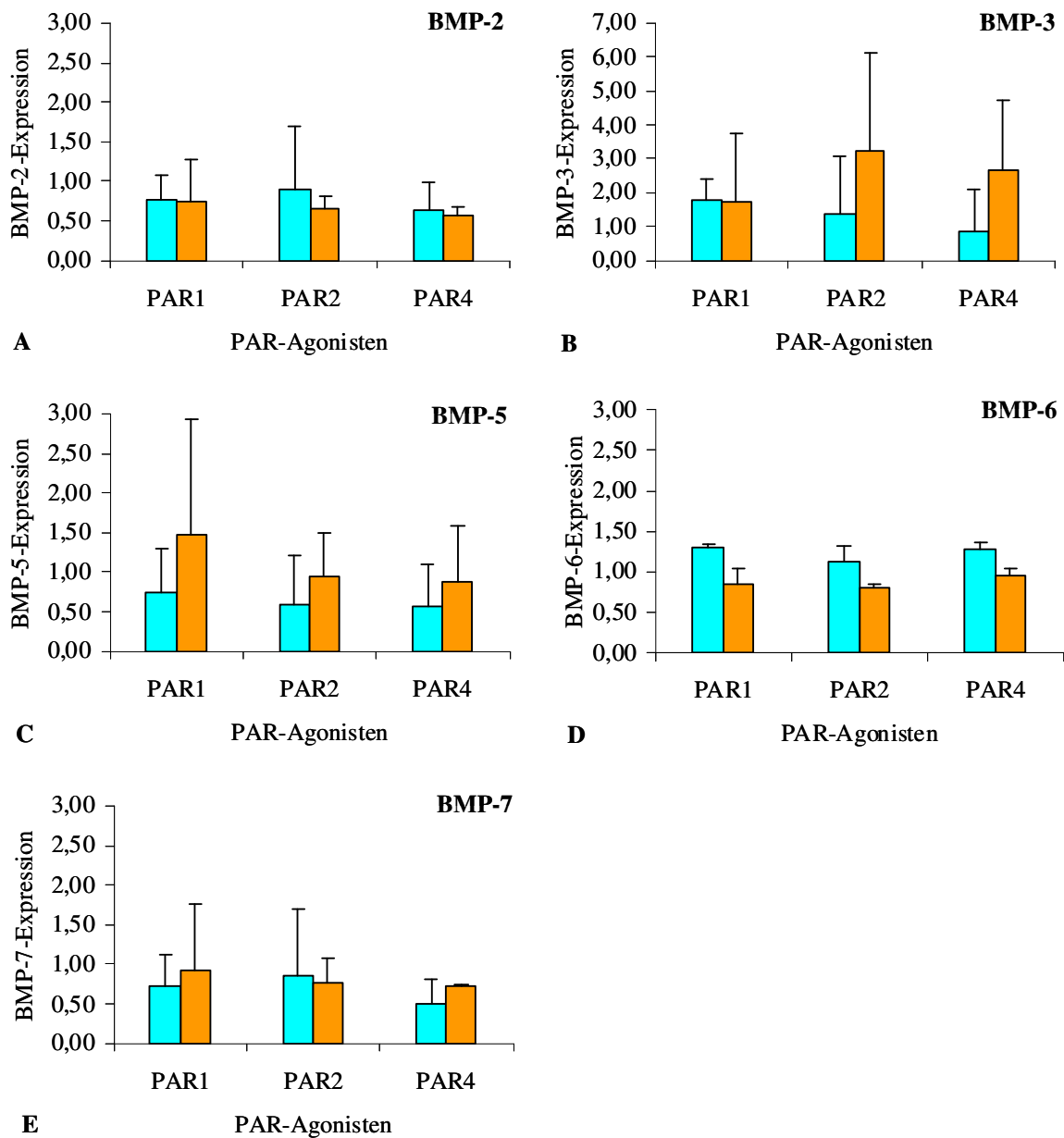


Abb. F1 Expressionslevel von BMP-2, BMP-3, BMP-5, BMP-6 und BMP-7 bei der Zelllinie Sk-Hep1 im Inkubationsversuch mit PAR-Agonisten PAR₁, PAR₂ und PAR₄.

Die Zellen wurden für 4h und 24h mit jeweils 100 µM des PAR₁-Agonisten, 10 µM des PAR₂-Agonisten und 400 µM des PAR₄-Agonisten inkubiert. Aus den Zellen wurde die Gesamt-RNA isoliert und die cDNA synthetisiert. Die Genexpression der BMPs wurde anschließend mittels realtime-PCR quantifiziert. Als interne Kontrolle diente das Housekeeping-Gen β -Aktin. Der Versuch wurde zweifach durchgeführt (n=2). Die erhaltenen Transkriptmengen wurden auf β -Aktin abgeglichen und auf die Kontrolle (serumfreies Medium) bezogen. Die so erhaltenen Expressionslevel wurden anschließend gemittelt und grafisch dargestellt. Die Kontrolle nimmt hierbei den Wert 1 an. Hierbei erscheinen die 4h-Werte als hellblaue und die 24h-Werte als orange Balken. Abb. **A** stellt das Expressionslevel von BMP-2 dar, Abb. **B** zeigt das Expressionslevel von BMP-3, Abb. **C** zeigt das Expressionslevel von BMP-5, Abb. **D** stellt das Expressionslevel von BMP-6 dar und Abb. **E** von BMP-7.

F2 Expressionslevel von BMP-Rezeptoren

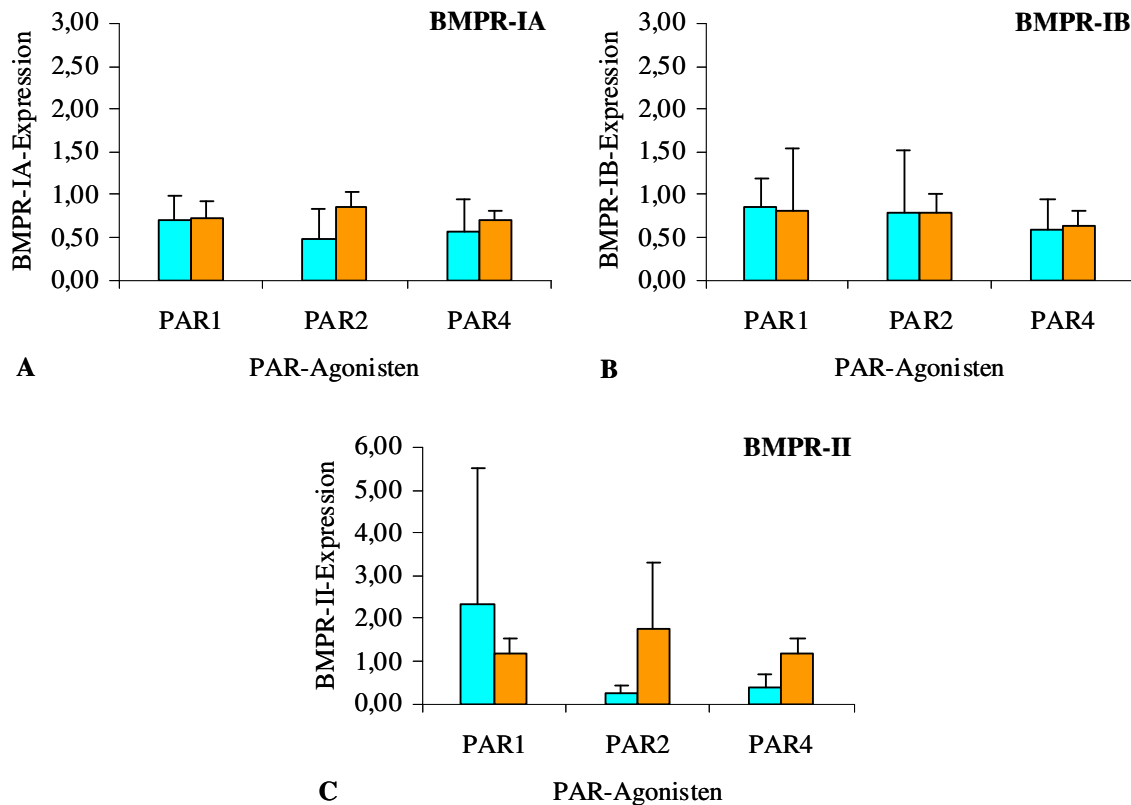


Abb. F2 Expressionslevel der BMP-Rezeptoren BMPR-IA, BMPR-IB und BMPR-II bei der Zelllinie Sk-Hep1 im Inkubationsversuch mit PAR-Agonisten PAR₁, PAR₂ und PAR₄.

Die Zellen wurden für 4h und 24h mit jeweils 100 µM des PAR₁-Agonisten, 10 µM des PAR₂-Agonisten und 400 µM des PAR₄-Agonisten inkubiert. Aus den Zellen wurde die Gesamt-RNA isoliert und die cDNA synthetisiert. Die Genexpression der BMP-Rezeptoren wurde anschließend mittels realtime-PCR quantifiziert. Als interne Kontrolle diente das Housekeeping-Gen β -Aktin. Der Versuch wurde zweifach durchgeführt (n=2). Die erhaltenen Transkriptmengen wurden auf β -Aktin abgeglichen und auf die Kontrolle (serumfreies Medium) bezogen. Die so erhaltenen Expressionslevel wurden anschließend gemittelt und grafisch dargestellt. Die Kontrolle nimmt hierbei den Wert 1 an. Hierbei erscheinen die 4h-Werte als hellblaue und die 24h-Werte als orange Balken. Abb. **A** stellt das Expressionslevel vom BMPR-IA dar, Abb. **B** zeigt das Expressionslevel vom BMPR-IB und Abb. **C** zeigt das Expressionslevel vom BMPR-II.

F3 Expressionslevel von Aktivinrezeptoren

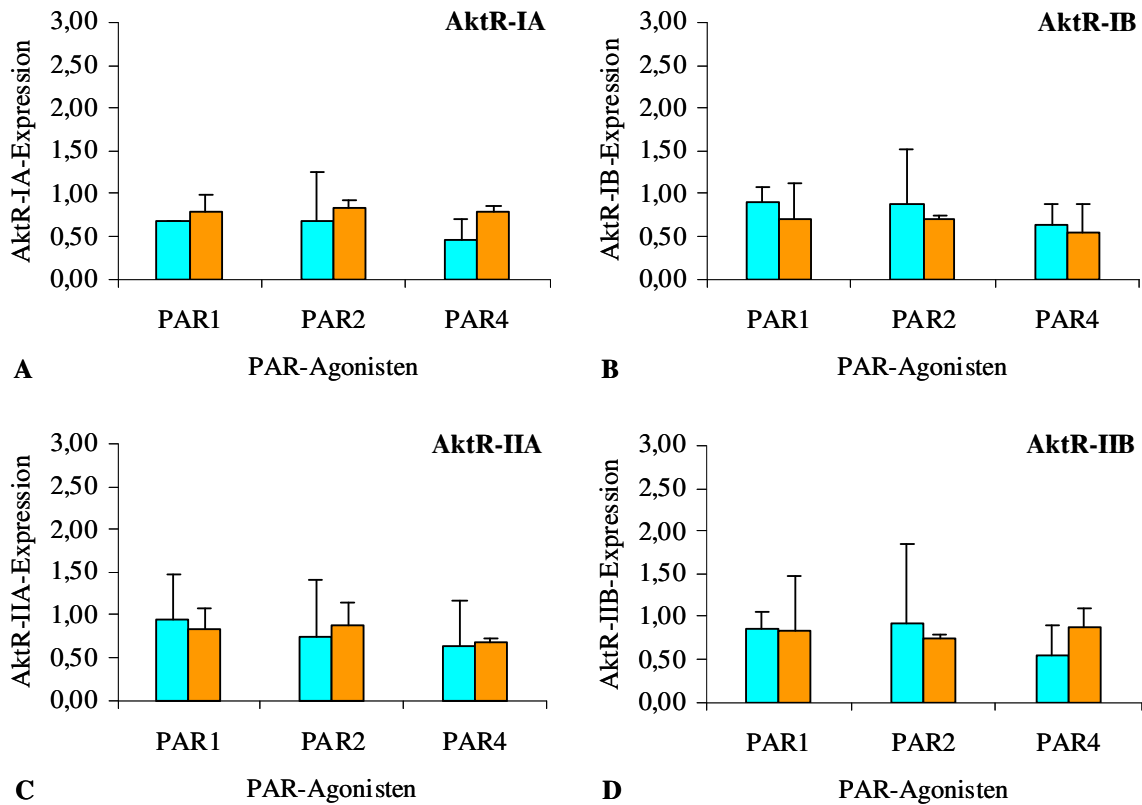


Abb. F3 Expressionslevel der Aktivinrezeptoren AktR-IA, AktR-IB, AktR-IIA und AktR-IIB bei der Zelllinie Sk-Hep1 im Inkubationsversuch mit PAR-Agonisten PAR₁, PAR₂ und PAR₄.

Die Zellen wurden für 4h und 24h mit jeweils 100 μ M des PAR₁-Agonisten, 10 μ M des PAR₂-Agonisten und 400 μ M des PAR₄-Agonisten inkubiert. Aus den Zellen wurde die Gesamt-RNA isoliert und die cDNA synthetisiert. Die Genexpression der Aktivinrezeptoren wurde anschließend mittels realtime-PCR quantifiziert. Als interne Kontrolle diente das Housekeeping-Gen β -Aktin. Der Versuch wurde zweifach durchgeführt (n=2). Die erhaltenen Transkriptmengen wurden auf β -Aktin abgeglichen und auf die Kontrolle (serumfreies Medium) bezogen. Die so erhaltenen Expressionslevel wurden anschließend gemittelt und grafisch dargestellt. Die Kontrolle nimmt hierbei den Wert 1 an. Hierbei erscheinen die 4h-Werte als hellblaue und die 24h-Werte als orange Balken. Abb. **A** stellt das Expressionslevel vom AktR-IA dar, Abb. **B** zeigt das Expressionslevel vom AktR-IB, Abb. **C** zeigt das Expressionslevel vom AktR-IIA und Abb. **D** stellt das Expressionslevel vom AktR-IIB dar.

F4 Expressionslevel von BMP-Inhibitoren

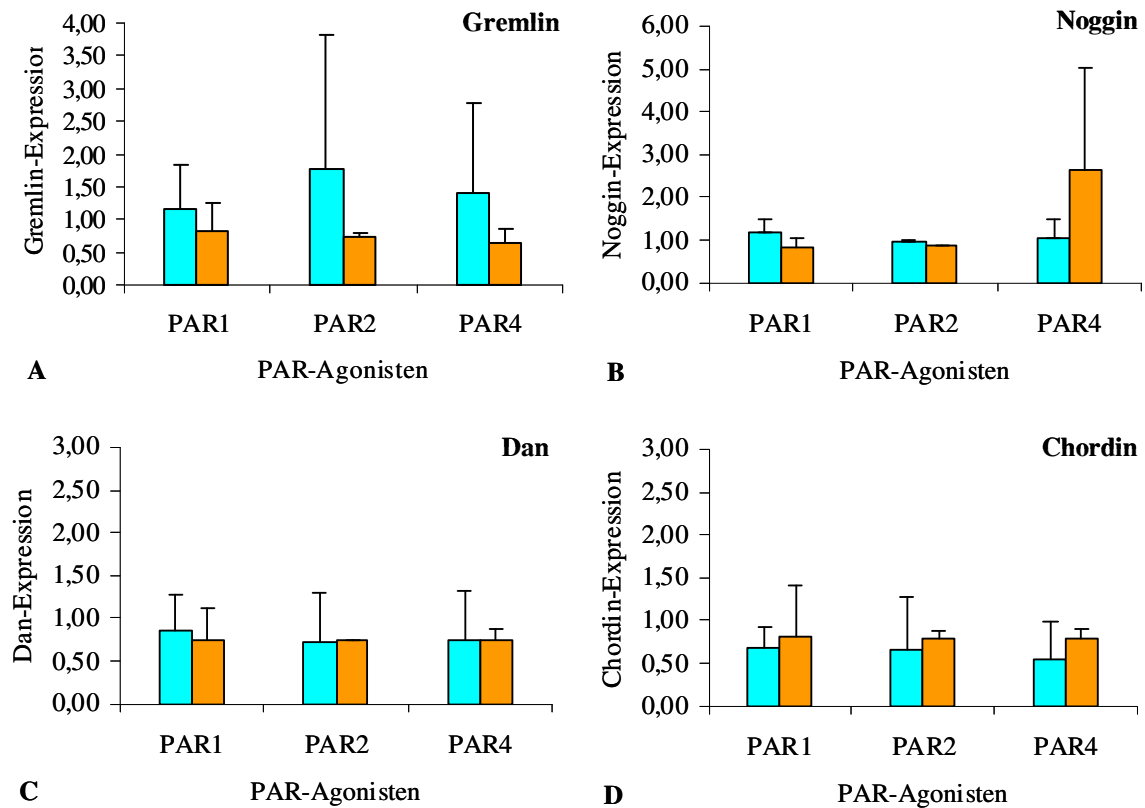


Abb. F4 Expressionslevel der BMP-Inhibitoren Gremlin, Noggin, Dan und Chordin bei der Zelllinie Sk-Hep1 im Inkubationsversuch mit PAR-Agonisten PAR₁, PAR₂ und PAR₄.

Die Zellen wurden für 4h und 24h mit jeweils 100 µM des PAR₁-Agonisten, 10 µM des PAR₂-Agonisten und 400 µM des PAR₄-Agonisten inkubiert. Aus den Zellen wurde die Gesamt-RNA isoliert und die cDNA synthetisiert. Die Genexpression der BMP-Inhibitoren wurde anschließend mittels realtime-PCR quantifiziert. Als interne Kontrolle diente das Housekeeping-Gen β -Aktin. Der Versuch wurde zweifach durchgeführt (n=2). Die erhaltenen Transkriptmengen wurden auf β -Aktin abgeglichen und auf die Kontrolle (serumfreies Medium) bezogen. Die so erhaltenen Expressionslevel wurden anschließend gemittelt und grafisch dargestellt. Die Kontrolle nimmt hierbei den Wert 1 an. Hierbei erscheinen die 4h-Werte als hellblaue und die 24h-Werte als orange Balken. Abb. A stellt das Expressionslevel von Gremlin dar, Abb. B zeigt das Expressionslevel von Noggin, Abb. C zeigt das Expressionslevel von Dan und Abb. D stellt das Expressionslevel von Chordin dar.

F5 Expression von BMP-Zielgenen

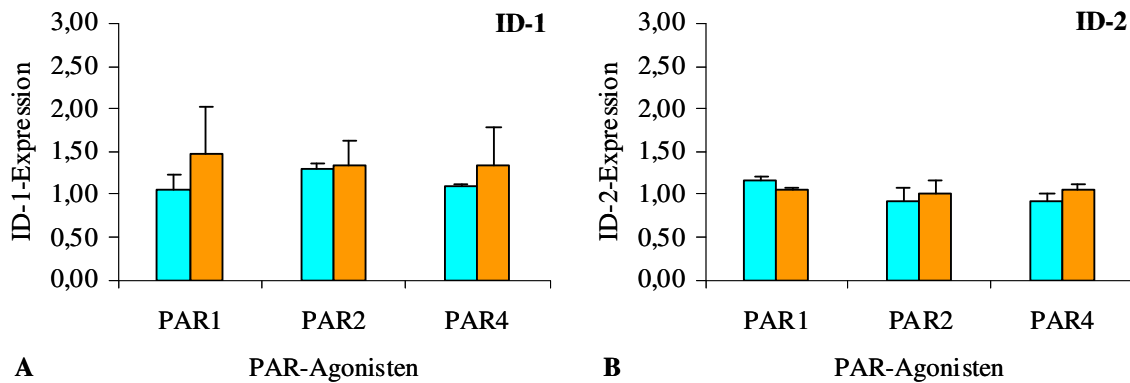


Abb. F5 Expressionslevel der BMP-Zielgene ID-1 und ID-2 bei der Zelllinie Sk-Hep1 im Inkubationsversuch mit PAR-Agonisten PAR₁, PAR₂ und PAR₄.

Die Zellen wurden für 4h und 24h mit jeweils 100 μ M des PAR₁-Agonisten, 10 μ M des PAR₂-Agonisten und 400 μ M des PAR₄-Agonisten inkubiert. Aus den Zellen wurde die Gesamt-RNA isoliert und die cDNA synthetisiert. Die Genexpression von ID-1 und ID-2 wurde anschließend mittels realtime-PCR quantifiziert. Als interne Kontrolle diente das Housekeeping-Gen β -Aktin. Der Versuch wurde zweifach durchgeführt (n=2). Die erhaltenen Transkriptmengen wurden auf β -Aktin abgeglichen und auf die Kontrolle (serumfreies Medium) bezogen. Die so erhaltenen Expressionslevel wurden anschließend gemittelt und grafisch dargestellt. Die Kontrolle nimmt hierbei den Wert 1 an. Hierbei erscheinen die 4h-Werte als hellblaue und die 24h-Werte als orange Balken. Abb. **A** stellt das Expressionslevel von ID-1 dar, Abb. **B** zeigt das Expressionslevel von ID-2.

G Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. med. K. Höffken für die freundliche Überlassung des Themas meiner Doktorarbeit und die ausgezeichneten Arbeitsmöglichkeiten im Onkologischen Forschungslabor sowie Prof. Dr. med. U. Settmacher für die Möglichkeit der Kooperation mit der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei meinem Betreuer Dr. J. H. Clement, Leiter des Onkologischen Forschungslabors, für die hervorragende Unterstützung während der Erstellung dieser Arbeit und die Geduld, mit der er meine vielen Fragen stets beantwortete.

Mein Dank gilt ebenso Herrn Dr. R. Kaufmann, Leiter des Forschungslabors für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie, für die Hilfsbereitschaft, die ausgezeichnete Zusammenarbeit und die Nutzung der Laborflächen.

Herzlich möchte ich mich bei dem gesamten Team des Onkologischen Forschungslabors für die freundliche Aufnahme, die wertvolle Unterstützung beim Erlernen der Arbeitstechniken, die tolle Arbeitsatmosphäre und die stetige Hilfsbereitschaft bedanken.

Ebenso danke ich den Mitarbeiterinnen des Forschungslabors für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie für die freundliche Aufnahme und ihre Unterstützung bei der Durchführung der Migrations-Assays.

Ich danke dem IZKF für die finanzielle Unterstützung, die einen Großteil meiner Experimente ermöglichte und somit nicht unwesentlich zu den Ergebnissen beigetragen hat.

Mein größter Dank gilt meiner Familie und Michael Steiner dafür, dass sie immer an mich geglaubt haben, für die Unterstützung während des gesamten Studiums und die aufmunternden Worte zur richtigen Zeit.

H Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Dr. J. H. Clement und Dr. R. Kaufmann,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Arbeit stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Erfurt, den 08.11.2009

Tina Baumann, Verfasserin